

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



Péptidos para a detecção de agregados de alfa-sinucleína

Letícia Alves do Quental

DISSERTAÇÃO

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



Péptidos para a detecção de agregados de alfa-sinucleína

Letícia Alves do Quental

Dissertação orientada pela Doutora Goreti Morais e pelo
Professor Doutor Rui Moreira

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2013

Aos meus Pais.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Isabel Rego dos Santos por me ter aceitado na sua equipa, e ter possibilitado a realização da minha tese na unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas. Agradeço-lhe a simpatia e disponibilidade com que me recebeu.

Ao Professor Doutor Rui Moreira agradeço ter aceitado ser o meu co-orientador, a disponibilidade demonstrada e tudo o que me ensinou ao longo do ano lectivo deste Mestrado.

Ao Doutor António Paulo expresse o meu reconhecimento por toda a ajuda que me deu ao longo do meu percurso no IST/ITN, pelo apoio científico e incentivo demonstrado, pelos conhecimentos transmitidos, e pela sua constante capacidade de discussão e inovação.

À Doutora Paula Raposinho agradeço toda a ajuda que me deu nos estudos biológicos, a maneira como me orientou e esclareceu dúvidas, e a disponibilidade que demonstrou no processo de revisão da tese.

Ao Doutor Sérgio Marques agradeço os cálculos de logP com o programa *QikProp*. Ao Doutor Hugo Miranda agradeço os estudos realizados no IMM e a disponibilidade demonstrada, e ao Doutor Tiago Outeiro agradeço ter possibilitado a realização desses estudos no seu grupo.

Ao Doutor Joaquim Marçalo agradeço a disponibilidade para esclarecer alguns dos espectros de ESI-MS realizados, assim como a execução dos mesmos. À Vânia Sousa agradeço a realização da análise elementar.

À Doutora Célia Maria Fernandes agradeço toda a ajuda que me deu, especialmente com o HPLC, a realização dos espectros de ESI-MS, e, sobretudo, a preocupação constante, a simpatia e a boa disposição que transmitia diariamente.

À Doutora Paula Campello agradeço o facto de ter estado sempre disponível para me ajudar e ensinar, o facto de me ter “emprestado” o seu laboratório para fazer a síntese dos meus péptidos, e o auxílio que me deu nos IV's.

Ao Doutor João Galamba e ao Maurício Morais agradeço a ajuda preciosa que me deram na minha entrada no “mundo dos péptidos”, e a disponibilidade constante que tiveram no esclarecimento de dúvidas.

À Elisa e ao Bruno agradeço a forma simpática e calorosa como me receberam no laboratório, e toda a vossa ajuda. Agradeço ainda o facto de aturarem as minhas parvoíces, cantorias e piadas diárias!

À Verinha agradeço por este ano de aventura em comum. Foi uma sorte encontrar no mesmo laboratório alguém como tu, alguém com o mesmo humor, sarcasmo e boa disposição que eu! Sem ti isto teria sido muito mais difícil. Obrigada por teres sido o meu muro das lamentações quando tudo corria mal, e a minha parceira de conversas nos dias bons. Ao Filipe agradeço pela imensa ajuda que me deste no HPLC preparativo, por me ajudares no “mundo dos péptidos” e por todas as dúvidas esclarecidas. E, claro, obrigada por toda a parvoíce e estupidez natural, por entenderes e gostares da minha ironia e tontice, e pelo constante sorriso de boa disposição! Vocês os dois foram essenciais para que esta experiência fosse mais interessante e divertida. Agradeço a ambos por tudo, mas sobretudo pela amizade.

À Inês e ao Patrique agradeço a maneira calorosa e simpática com que me receberam no laboratório QIR-I! À Sofia M. e à Susana agradeço toda a disponibilidade e ajuda demonstrada, a forma amável com que me receberam no laboratório QIR-II, e a companhia nas horas de almoço.

À Sofia Gama, Filipa e ao Francisco agradeço a forma calorosa, amável e bem-disposta com que me receberam e trataram durante todo este tempo. À Sofia agradeço ainda toda a ajuda científica que me deu (com o programa *QuikProp* e na revisão da tese).

A todo o restante grupo de QIR agradeço a amabilidade com que me receberam, e a disponibilidade demonstrada sempre que precisei de ajuda.

À Ana Peixoto agradeço por tudo. Sem si não teria passado a barreira do 1º ano deste Mestrado, e nada disto teria sido possível, e por isso estar-lhe-ei eternamente grata.

Ao Ângelo agradeço as milhentas dúvidas que me esclareceste ao longo do 1º ano de Mestrado. Ao André e à Catarina agradeço a amizade, e a vossa companhia nas tardes de estudo. À Marta, por ter sido uma óptima colega de casa, e por te teres tornado uma boa amiga.

Ao Jorge, Nadine e Daniel agradeço as jantaradas e saídas, que por vezes acabaram por funcionar como “terapia” para os meus problemas químicos. A vossa amizade e boa-disposição foram essenciais neste processo!

Aos meus amigos satenses (Nuno, Beta, Sónia, Susana, Diana, Filipe, Amadeu, João) agradeço por tudo ao longo do meu percurso académico: desde a amizade e companhia, até à vossa capacidade para me aturarem! Espero que continuem por aqui para sempre!

Ao Dani agradeço o facto de me fazeres esquecer que sou uma adulta, por me continuares a chatear, como habitual, e seres o mesmo irmão “Zé” desde sempre. Adoro-te, e já sabes... és o meu irmão preferido! Aos meus avós agradeço o amor e preocupação constantes, e o facto de serem os avós presentes que são e sempre foram.

Aos meus pais agradeço por tudo! Sem vocês nada disso teria sido possível. Obrigada pelo apoio incondicional que me deram em toda a minha vida, por me terem feito acreditar que conseguia mesmo quando estive no limite de desistir, e por me amarem incondicionalmente. São os melhores pais do mundo e arredores, e por isso obrigada!

Por último, e sobretudo, agradeço à minha orientadora Goreti. Sei que não fui a pupila mais fácil do Mundo, e portanto agradeço-lhe por ter aturado as minhas reivindicações e o meu refilar constante. Agradeço por ter sido uma amiga quando precisei, sem nunca ter deixado de me orientar ao longo de todo este processo. Obrigada por toda a ajuda que me deu na escrita e execução desta tese, por todo o conhecimento transmitido e pelo estímulo constante. Muito obrigada!

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa irreversível e progressiva, com um impacto significativo na saúde pública, e para a qual ainda não foi encontrada uma cura. É causada por uma degeneração progressiva dos neurónios dopaminérgicos da substância negra. Caracteriza-se pela presença de inclusões intraneuronais de agregados de alfa-sinucleína. Até à data, o diagnóstico de DP é apenas confirmado pela detecção desses agregados *post-mortem*. A possibilidade de visualização dos agregados de alfa-sinucleína por técnicas de imagiologia permitirá um diagnóstico precoce da DP.

O objectivo principal desta tese é desenvolver compostos que interactuem selectivamente com os agregados de alfa-sinucleína. No futuro, a identificação de tais compostos permitirá desenvolver uma sonda radioactiva para detecção *in vivo* de alfa-sinucleína. Para isso, foi sintetizada uma família de novos péptidos, análogos de um péptido (ASI-1) inibidor da agregação da alfa-sinucleína. Esses péptidos foram estruturalmente modificados de modo a possibilitar o seu uso em imagiologia e/ou como inibidores mais potentes da agregação da alfa-sinucleína.

Os péptidos sintetizados contêm na sua estrutura um átomo de flúor. Estes péptidos são análogos inactivos dos péptidos radiofluorados que serão preparados posteriormente, caso se identifique um análogo promissor. A um dos péptidos fluorados conjugou-se uma molécula de glucose na tentativa de facilitar a sua passagem pela barreira hematoencefálica. Sintetizou-se um outro péptido, com propriedades fluorescentes, ao qual se conjugou o isotiocianato de fluoresceína, que possibilita o seu uso em estudos de ligação aos agregados. Sintetizaram-se dois péptidos já descritos na literatura, para controlo positivo e negativo da avaliação pré-clínica dos análogos sintetizados nesta tese.

Avaliou-se *in vitro* a ligação à alfa-sinucleína do péptido que contém a sonda fluorescente. Realizaram-se, ainda, estudos *in vitro* da estabilidade à degradação metabólica. No futuro avaliar-se-á a capacidade destes péptidos em inibirem e/ou desagregarem fibras de alfa-sinucleína. Pretende-se também preparar os compostos parentes radiofluorados.

Palavras-chave

Agregados

Alfa-sinucleína

Barreira hemato-encefálica

Doença de Parkinson

Péptidos

Síntese peptídica em fase sólida

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disorder with a significant impact on public health. It is caused by the progressive degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra. Histopathologically, PD is characterized by the presence of intraneuronal aggregates of alpha-synuclein. So far, the diagnosis of PD is only confirmed by the detection of these aggregates *post-mortem*. The *in vivo* visualization of alpha-synuclein aggregates by imaging techniques will allow for a reliable and early diagnosis of PD.

The main goal of this thesis is the development of compounds that selectively interact with aggregates of alpha-synuclein. The identification of such compounds will allow the development of radioactive probes for *in vivo* detection of alpha-synuclein, at later stage. Herein, we designed and synthesized a family of novel peptides, analogs of a peptide inhibitor of alpha-synuclein aggregation (ASI-1). These peptides were structurally modified to enable its use in imaging and/or as more potent inhibitors of alpha-synuclein aggregation.

The synthesized peptides contain in their structure a fluorine atom. These peptides are inactive congeners of the peptides that will be radiolabel afterward, if a promising fluorinated ASI-1 is identified. Moreover, the peptides contain either a glucose derivative or a fluorophore (fluorescein isothiocyanate) to facilitate its passage through the blood brain barrier and to enable its use in binding studies to the aggregates, respectively. We also synthesized ASI-1 and ASI-4 for positive and negative control of pre-clinical evaluation of the analogues synthesized in this thesis.

We have evaluated the *in vitro* binding to alpha-synuclein of the fluorinated peptide containing the fluorophore. *In vitro* studies of the metabolic stability to degradation were also performed. In the future it will be assess the ability of these peptides to inhibit and/or disaggregating alpha-synuclein fibrils. We also intended to prepare the radiolabeled parent compounds.

Key-words

Aggregates

Alfa-synuclein

Blood brain barrier

Parkinson's disease

Peptides

Solid phase peptide synthesis

Índice geral

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	IV
Palavras-chave.....	V
Abstract	VI
Key-words.....	VII
Lista de abreviaturas	XI
Índice de tabelas	XIII
Índice de figuras	XIII
Índice de esquemas	XIV
Índice de gráficos	XIV
1. Introdução	2
1.1. Doença de Parkinson.....	2
1.2. Sinucleínas	3
1.2.1. Alfa-sinucleína	3
1.3. Compostos que interagem com a alfa-sinucleína	8
1.3.1. Compostos que interferem com a fibrilhogénese da alfa-sinucleína	8
1.3.2. Compostos para a visualização de fibras de alfa-sinucleína	15
1.4. Péptidos como agentes terapêuticos	17
1.4.1. Transporte de péptidos através da barreira hemato-encefálica.....	18
1.5. Fluorescência.....	20
2. Síntese de péptidos análogos do ASI-1	24
2.1. Objectivos do trabalho.....	25
2.2. Formação da ligação amida.....	26
2.3. Síntese de péptidos	27
2.3.1. Síntese de péptidos em fase sólida	28
2.3.2. Suporte sólido.....	30
2.3.3. Teste de Kaiser	32
2.4. Resultados e Discussão	33
2.4.1. Activação do ácido 4-fluorobenzoico.....	33
2.4.2. Hidrólise do grupo protector da ϵ -amina.....	37
2.4.3. Amidação da ϵ -amina do Fmoc-Lys-OH	40
2.4.4. <i>O</i> -Protecção da D-glucose.....	44
2.4.5. Síntese do (2'-carboxietil)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-tio-D-glucopiranosido (2.31) ...	46

2.4.6. Hidrólise dos grupos acetato	50
2.4.7. Síntese de péptidos	52
3. Avaliação preliminar dos análogos de ASI-1	58
3.1. Lipofilia dos péptidos	58
3.2. Interação, <i>in vitro</i> , do ASI-1d com a alfa-sinucleína	60
3.3. Estabilidade metabólica <i>in vitro</i> do péptido ASI-1d	63
3.2.1. Estabilidade em fígado de ratinho	63
3.2.2. Estabilidade em rim de ratinho	64
3.2.3. Estabilidade em soro humano	65
4. Considerações finais e perspectivas	68
5. Experimental	74
5.1. Aspectos gerais	74
5.2. Solventes e Reagentes	74
5.3. Técnicas de Purificação e Caracterização	74
5.3.1. Cromatografia em camada fina	74
5.3.2. Cromatografia em coluna	75
5.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Pressão	75
5.3.4. Ponto de fusão	78
5.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear	78
5.3.6. Análise elementar de C, H e N	79
5.3.7. Espectroscopia de Infravermelho	79
5.3.8. Espectrometria de Massa	79
5.4. Síntese dos compostos não-peptídicos	80
5.4.1. Síntese do <i>N</i> -succinimidil-4-fluorobenzoato (2.22)	80
5.4.2. Síntese do tetrafluorofenil-4-fluorobenzoato (2.24)	81
5.4.3. Hidrólise do grupo protector da ϵ -amina	82
5.4.4. Síntese do ácido 2-((((9H-fluoreno-9-il)metoxi)carbonil)amino) - 6-(4'-fluorobenzoato)hexanoíco (Fmoc-Lys(4-fluorobenzoíl)-OH) (2.27)	83
5.4.5. Acetilalação dos grupos hidroxilos da D-glucose	85
5.4.6. Síntese do ((2'-carboxi)etil)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-tio- β -D-glucopiranosido (2.31)	87
5.4.7. Hidrólise dos grupos acetatos	88
5.5. Síntese das sequências peptídicas	89
5.5.1. Síntese de péptidos	89
5.6. Estudos de fluorescência	98
5.7. Estudos de estabilidade/metabolismo <i>in vitro</i>	99

5.7.1. Estabilidade em fígado e rins	99
5.7.2. Estabilidade em soro humano	99
6. Referências Bibliográficas	102

Lista de abreviaturas

A

A-beta: beta-amilóide

α -sin: Alfa-sinucleína

ACN: Acetonitrilo

ASI: Inibidores de α -sin

B

BHE: Barreira hemato-encefálica

Boc: *t*-Butiloxicarbonilo

D

DCC: *N,N*-diciclohexilcarbodiimida

DCM: Diclorometano

DCU: *N,N'*-diciclohexilureia

DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DP: Doença de Parkinson

E

ESI: Ionização de Electrospray

F

FBA: Ácido 4-benzoíco

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

Fmoc: 9-Fluorenilmetiloxicarbonil

G

gCOSY: Espectroscopia de correlação homonuclear com gradiente

GLUT1: Transportador da glucose-1

H

HBTU: *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1 *H*-benzotriazol-1-il) urónio hexafluorofosfato

HOBt: 1-Hidroxi-1*H*-benzotriazolo

HPLC: Cromatografia líquida de alta pressão

HPLC-RP: Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

HSQC: Coerência heteronuclear quântica única, do inglês *Heteronuclear single quantum coherence*

I

IV: Espectroscopia de infravermelho

L

LBs: Corpos de Lewis

LogP: Coeficiente de partição

M

Min: Minuto(s)

MPA: Ácido mercaptopropiónico

MS: Espectrometria de massa

MSA: Atrofia sistémica múltipla

Mtt: Metiltritol

P

p.f.: Ponto de fusão

Pbf: Pentametildihidrobenzofurano sulfonil

PET: Tomografia de emissão de positrões

pTau: Proteína Tau

R

RMN: Ressonância magnética e nuclear

ROS: Espécies reactivas de oxigénio

S

SFB: *N*-succinimidil benzoato

SNC: Sistema nervoso central

SPECT: Tomografia computadorizada de emissão de fotão único

SPPS: Síntese de péptidos em fase sólida

T

TFA: Ácido trifluoroacético

ThT: Tioflavina T

TIS: Triisopropilsilano

TLC: Cromatografia em camada fina

TMS: Tetrametilsilano

t_R: Tempo de retenção

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

V

VC: Vermelho de Congo

Índice de tabelas

2.1.	Relação quantidade FBA/rendimento 2.22.....	34
2.2.	Condições de acetilação dos grupos hidroxilo	45
2.3.	Caracterização por ESI-MS e HPLC dos diferentes péptidos	56
3.1.	Valores computacionais de logP dos péptidos ASI-1, ASI-4 e ASI-1 (a-e).....	59

Índice de figuras

1.1.	Representação esquemática do neurónio dopaminérgico na substância negra.....	3
1.2.	Representação da família das proteínas de sinucleína humana	5
1.3.	Estrutura secundária dos agregados de α -sin em folha β	5
1.4.	Representação do modelo de glicosilação de α -sin responsável pela morte neuronal	7
1.5.	Exemplos de pequenas moléculas que interferem com a fibrillogénese da α -sin.....	9
1.6.	Estrutura química do ASI-1	11
1.7.	Representação esquemática do possível mecanismo de acção dos ASI	12
1.8.	Estrutura química do “tweezer” molecular CLR01	14
1.9.	Mecanismo de acção dos “tweezers” moleculares	14
1.10.	Estruturas químicas da tioflavina T e do vermelho de congo.....	15
1.11.	Estrutura química de compostos radioactivos com afinidade para a alfa-sinucleína	16
1.12.	Deslocação de Stokes	22
1.13.	Sondas fluorescentes mais comuns	22
2.1.	Análogos de ASI-1 como agentes imagiológicos para a detecção <i>in vivo</i> de agregados de α -sin.....	24
2.2.	Representação esquemática da SPPS	29
2.3.	Exemplos de suportes sólidos: Cloreto de tritilo (2.10); Rink Amide MBHA (2.11)	31
2.4.	Teste de Kaiser	33
2.5.	Ampliação do espectro de gCOSY dos protões alifáticos H^e , H^{δ} , H^{γ} e do H^{β} do composto 2.26.....	39
2.6.	Ampliação do espectro de gCOSY dos protões aromáticos do composto 2.26.....	40
2.7.	Ampliação do espectro de gCOSY dos protões alifáticos do composto 2.27	42
2.8.	Ampliação do espectro de HSQC da região alifática do composto 2.27	43
2.9.	Ampliação do espectro de HSQC da região aromática do composto 2.27	43
2.10.	Espectro de gCOSY do composto 2.29	45
2.11.	Ampliação do espectro de gCOSY dos protões do anel piranosido do composto 2.31..	49

2.12.	Espectro de gCOSY do composto 2.33	51
2.13.	Espectro de HSQC do composto 2.33	51
2.14.	Péptido ASI-1a	53
3.1.	Estabilidade do péptido ASI-1d em homogenado de fígado	64
3.2.	Estabilidade do péptido ASI-1d no soro humano	66

Índice de esquemas

2.1.	Activação do ácido carboxílico na formação da ligação amida	26
2.2.	Representação da activação de ácidos carboxílicos com DCC	27
2.3.	Mecanismo da reacção de α -aminoácidos com hidrato de ninidrina para formar o complexo de Ruheman	32
2.4.	Síntese do SFB	34
2.5.	Síntese do tetrafluorofenil-4-fluorobenzoato (2.24)	35
2.6.	Hidrólise do grupo N- ϵ - <i>t</i> -Boc	38
2.7.	Síntese do Fmoc-Lys (4-fluorobenzoíl)-OH	41
2.8.	Síntese da D-glucose-pentaacetato (2.29)	45
2.9.	Síntese do (2' carboxietil)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-tio-D-glucopiranosido (2.30)	47
2.10.	Mecanismo proposto para a formação do composto 2.31	48
2.11.	Representação esquemática da hidrólise dos grupos <i>O</i> -acetato	50
2.12.	Representação da síntese dos análogos de ASI-1	53
4.1.	Síntese do [¹⁸ F]-SFB	71

Índice de gráficos

3.1.	Espectro de fluorescência do ASI-1d na ausência e presença de monómeros e fibras de α -sin	61
3.2.	Espectro de fluorescência do ASI-1d na ausência e presença de fibras de α -sin	61
3.3.	Espectro de fluorescência do ASI-1d na presença de monómeros de α -sin a diferentes tempos	62
3.4.	Relação entre o tempo de incubação e a intensidade de fluorescência do ASI-1d	62
3.5.	Metabolização do péptido ASI-1d em soro humano	65

Introdução

1. Introdução

1.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum. Foi descrita pela primeira vez em 1817, pelo médico James Parkinson, e é caracterizada por perda progressiva do controlo muscular, com alterações motoras, nomeadamente tremor, bradicinésia e rigidez muscular. Causa uma debilidade considerável aos doentes na execução das tarefas diárias, com significativo impacto quer no ambiente familiar, quer na sociedade.¹ Tem uma prevalência de cerca de 2% após os 65 anos de idade e que tende a crescer com o aumento da idade.^{2,3} Apesar de menos comum, a DP pode também manifestar-se mais cedo (entre 21-40 anos), ou até na idade juvenil (antes dos 21 anos).¹ Com o aumento da esperança de vida das populações prevê-se que a incidência desta doença aumente, representando um sério problema de saúde pública.^{2,3}

A DP caracteriza-se pela progressiva deterioração dos neurónios dopaminérgicos na substância negra. Em condições fisiológicas estas células nervosas produzem dopamina (**Figura 1.1**), o neurotransmissor responsável pela comunicação entre a substância negra e o corpo *striatum*, para coordenação dos movimentos voluntários.³ Uma diminuição ou perda total deste neurotransmissor causa perda da capacidade do controlo motor do organismo. Como consequência, outras células cerebrais também sofrem degeneração, contribuindo dessa forma para os sintomas não motores da DP. Apesar de ainda não ser claro o mecanismo pelo qual as células neuronais deixam de produzir dopamina, os factores genéticos e ambientais parecem ter um papel relevante.^{2,3,4}

O diagnóstico da DP é baseado principalmente na história clínica do doente e através de exames neurológicos. A avaliação da função dopaminérgica, através do uso das sondas moleculares ¹⁸F-fluorodopa ou ¹²³I-CIT, é também uma prática comum, em adição à ressonância magnética do cérebro do doente suspeito de sofrer de DP. Contudo, o diagnóstico apenas pode ser confirmado *post-mortem*, através de um exame histopatológico à substância negra, pela detecção de corpos de Lewis (LBs).^{5,6} Até à data não existe uma cura para a DP.^{2,3}

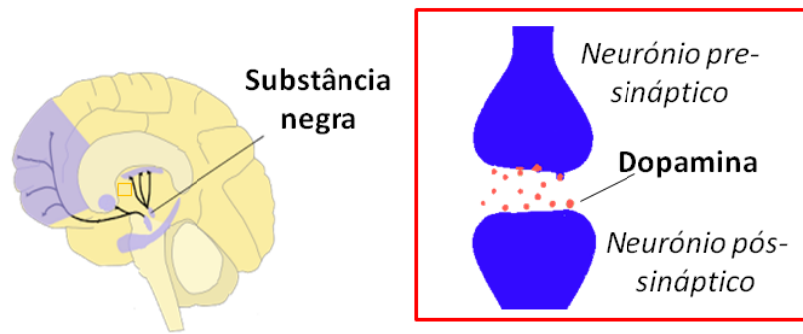


Figura 1.1. Representação esquemática do neurónio dopaminérgico na substância negra.

A neuroprotecção continua a ser um desafio importante na investigação da DP. Pesquisas futuras devem focar-se no desenvolvimento de novos biomarcadores e radiotraçadores para a doença. Desta forma, a presença de LBs nos neurónios dopaminérgicos tem levado a um crescente interesse na avaliação das suas proteínas constituintes, as sinucleínas, como potenciais alvos na detecção da doença.⁴

1.2. Sinucleínas

As sinucleínas (**Figura 1.2-A**) são proteínas pequenas, solúveis, que se expressam em células neuronais vertebradas e em alguns tumores. São proteínas que têm na região N-terminal uma ligação lipídica α -helical (**Figura 1.2-B**), semelhante ao domínio das ligações lipídicas classe A2 das apolipoproteínas, que intervêm na ligação às vesículas fosfolipídicas.² Existem três famílias de sinucleínas: α , β e γ . As sinucleínas α e β localizam-se sobretudo no tecido cerebral, maioritariamente na região pré-sináptica dos terminais nervosos enquanto que a sinucleína γ se encontra principalmente no sistema nervoso periférico e na retina.^{1,3}

1.2.1. Alfa-sinucleína

A alfa-sinucleína (α -sin) é uma proteína pré-sináptica, com 140 aminoácidos, expressa nos neurónios. Apesar da função da α -sin ainda não ser completamente conhecida,

vários estudos sugerem que está envolvida na modulação da transmissão sináptica, na densidade das vesículas sinápticas e na plasticidade neuronal. No entanto, a α -sin não parece ser necessária no desenvolvimento neuronal, pois outras vias alternativas estão presentes.⁷

O elevado interesse na α -sin teve início a partir de evidências histopatológicas e genéticas que sugeriram que esta proteína tem um papel relevante no desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas, tais como a DP, demência dos LBs e atrofia sistêmica múltipla (MSA). Estas doenças são caracterizadas histopatologicamente pela inclusão intraneuronal de LBs. Os LBs são constituídos essencialmente por agregados de α -sin. Por essa razão, estas doenças são também conhecidas como sinucleinopatias.^{2,3,8} Foi também demonstrado que as mutações no gene da α -sin (A53T, A30P e E46K) podem alterar a estrutura da proteína, favorecendo a auto-agregação e a formação de LBs, e estão relacionadas com manifestação precoce da DP.^{3,7} Para além disso, através de estudos *in vivo* num modelo transgénico *Drosophila* foi estabelecida uma ligação etiológica entre a agregação de α -sin e a toxicidade dos neurónios dopaminérgicos.⁸ Outros modelos de ratos transgénicos, com expressão aumentada do gene da α -sin, evidenciaram disfunções neuronais e perda dos neurónios pré-sinápticos e terminais sinápticos, assim como lesões celulares semelhantes às que se encontram no cérebro de doentes de Parkinson.⁷

A estrutura primária da α -sin é constituída por três regiões distintas (**Figura 1.2-A**)^{2,3,7}:

- Região N-terminal (anfipática: resíduos 1-60);
- Região central (hidrofóbica: resíduos 61-95);
- Região C-terminal (cauda hidrofílica acídica: resíduos 96-140).

A característica mais relevante da região N-terminal e da parte inicial da região central é a repetição da sequência de aminoácidos “KTKEGV”. Não obstante, enquanto as regiões N-terminal e hidrofóbica são conservadas entre espécies, a região C-terminal é variável em tamanho e sequência nas diferentes espécies.^{2,3,7}

Normalmente, a α -sin na forma nativa existe num estado não entrelaçado e é altamente solúvel (**Figura 1.2-B**). Num processo patológico, a α -sin forma agregados insolúveis altamente ordenados denominados por fibras amilóides.⁹ Os agregados de α -sin podem

estar estabilizados de várias formas, no entanto a forma fibrilar (estrutura proteica da folha β com pregas) é a mais comum e a mais estudada (**Figura 1.3**).³

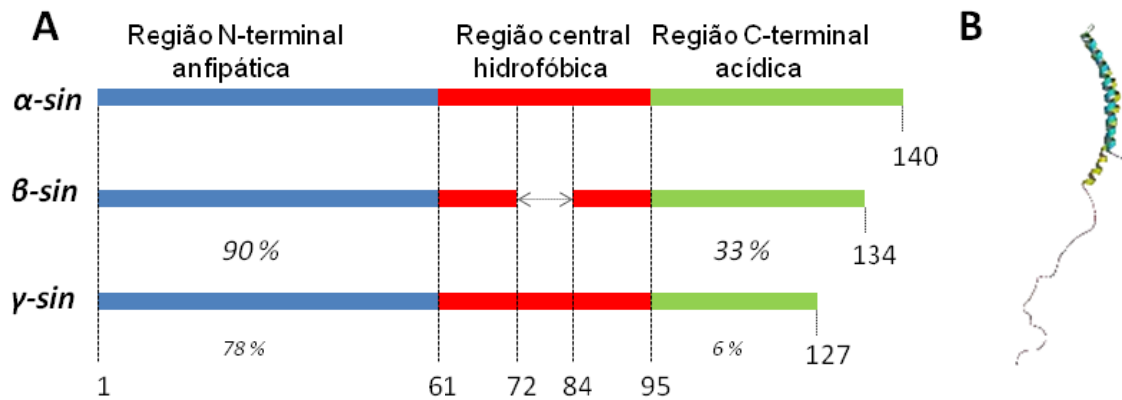


Figura 1.2. A-Representação da família das proteínas de sinucleína humana (os valores indicados na β- e γ-sin representam a percentagem de aminoácidos comuns com α-sin)⁷; B-Estrutura da α-sin.⁹

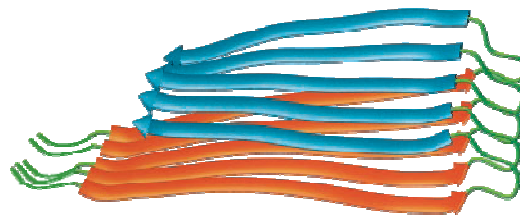


Figura 1.3 Estrutura secundária dos agregados de α-sin em folha β (Adaptado de A. T. Petkova e colaboradores¹⁰).

Pensa-se que a α-sin progride de monómeros desestruturados para intermediários parcialmente entrelaçados, e finalmente alonga-se em filamentos maduros. A polimerização da α-sin de monómeros desestruturados para fibras amilóides maduras ricas em folhas β ocorre através da formação de vários oligómeros de tamanho variável (**Figura 1.4**). Estes polímeros podem ser visualizados e estudados por técnicas como a microscopia electrónica, microscopia de força atómica e cromatografia de exclusão por tamanho. Apesar de não ser consensual, alguns investigadores acreditam que os oligómeros pequenos pré-fibrilares de α-sin são as espécies mais tóxicas, principalmente devido à sua maior capacidade de difusão na área afetada, conduzindo,

por isso, à disfunção e degeneração neuronal. Por fim, a α -sin é sequestrada em inclusões intraneuronais, os chamados LBs.⁷

Existem vários mecanismos propostos para a toxicidade neuronal (perda neuronal e/ou dos oligodendrócitos) da α -sin, dos quais se destacam⁷:

- Aumento na abundância intracelular de α -sin monomérica;
- Formação excessiva de espécies potencialmente tóxicas, tais como os oligómeros ou protofibrilhas de α -sin;
- Polimerização anormal de α -sin em filamentos que conduzem à formação de grandes inclusões intracitoplasmáticas (LBs).

Há vários factores que podem acelerar ou facilitar a agregação da α -sin, nomeadamente mutações, truncações, aumento da temperatura, diminuição do pH, interações com metais específicos e/ou pequenas moléculas, e stress oxidativo. A interacção da α -sin com a proteína β -amilóide (A-beta) pode também promover a formação de LBs.⁷ Do mesmo modo, existe uma sinergia entre a proteína Tau (pTau) e a α -sin, já que foi demonstrado, *in vitro*, que a sobre-expressão de α -sin humana mutada em ratos transgénicos induz a formação de inclusões de filamentos de pTau e de LBs.¹¹

A nível molecular foi demonstrado, em estudos *in vivo* com modelos de DP, que a formação de formas nitradas e/ou fosforiladas de α -sin têm um papel crucial na patogénese da DP e de outras sinucleinopatias. Posteriormente, estudos imunoquímicos com amostras de cérebros humanos confirmaram a existência dessas formas de α -sin nitrada e fosforilada nos LBs.^{2,3} A glicosilação da α -sin também é um processo bioquímico que contribui para a agregação da proteína. Postulou-se que a α -sin glicosilada é mais resistente à degradação proteolítica, verificando-se uma acumulação cerebral excessiva desta proteína. Por outro lado, as proteínas glicosiladas geram uma grande quantidade de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na célula, conduzindo a um aumento do stress oxidativo.³ Este aumento de ROS desencadeia uma série de eventos bioquímicos, que terminam com a morte celular dos neurónios, tal como se observa na **Figura 1.4**. Adicionalmente, durante o processo de agregação, a α -sin gera peróxidos de hidrogénio (H_2O_2), contribuindo sinergicamente para o processo de stress oxidativo. Para além disso, a acumulação de α -sin pode levar a disfunção mitocondrial, que por sua vez gera ROS, e eventualmente causa morte neuronal.²

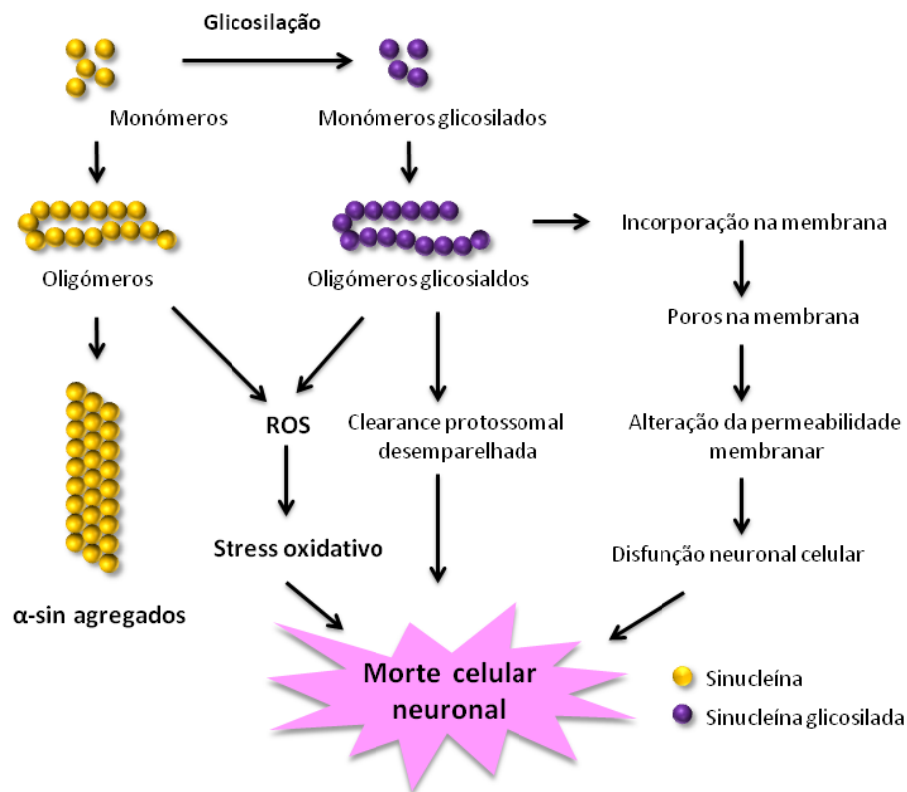


Figura 1.4. Representação do modelo de glicosilação de α -sin responsável pela morte neuronal (adaptado de E. Guerrero e colaboradores³).

Devido às suas propriedades de ligação às membranas lipídicas, a α -sin está implicada nas funções sinápticas, inclusive na disfunção neuronal. A α -sin apresenta dois modos distintos de interacção com membranas. No caso das membranas fosfolipídicas, a interacção é estável e espontânea, e a força motriz é a atracção electroestática. Esta interacção é mediada pelos dois terços das proteínas N-terminais, que consistem em sete cópias de uma repetição da sequência do resíduo 11. A interacção da α -sin com membranas fosfolipídicas altera a cinética da sua agregação.¹²

O outro tipo de interacção é mais dinâmico e independente de interacção iónica, e só ocorre em contexto citoplasmático, o que sugere que há co-factores citoplasmáticos envolvidos nesta interacção.¹²

Em situações patológicas, quando a α -sin se liga a moléculas lipídicas ou membranas fosfolipídicas, sofre uma mudança conformacional dramática de enrolamento aleatório, sob a influência da região N-terminal e da sequência de aminoácidos “KTKEGV”. Esta

alteração conduz, posteriormente, à fibrilhação e formação de agregados na α -sin.^{2,3} A associação de α -sin com membranas lipídicas acelera a formação de fibras amilóides, levando à formação de dímeros e oligómeros.^{2,3,7} Pensa-se que os oligómeros da α -sin afectam a permeabilidade da membrana de dois modos distintos: os oligómeros da α -sin integram-se na membrana, levando à formação de poros ou estruturas semelhantes a canais que podem causar descontrolo da permeabilidade membranar; ou, os oligómeros aumentam a habilidade dos iões se moverem pela bicamada membranar, sem a formação de poros.⁷

1.3. Compostos que interagem com a alfa-sinucleína

Tendo em conta que a formação de oligómeros insolúveis de α -sin é um evento central na patogénese da DP, algumas estratégias terapêuticas em investigação visam inibir a formação desses filamentos e/ou promover a sua dissolução e eliminação do cérebro. Têm também sido desenvolvidos compostos que se pretende que interactuem com os filamentos de α -sin, aos quais se conjuga um átomo radioactivo. Estes compostos têm sido estudados como potenciais sondas moleculares para a detecção *in vivo* dos agregados de α -sin.^{4,13}

1.3.1. Compostos que interferem com a fibrilhogénese da alfa-sinucleína

Entre os compostos que visam interferir com a fibrilhogénese da α -sin, as pequenas moléculas têm sido as mais estudadas. Por exemplo, as catecolaminas, como a dopamina, L-dopa, norepinefrina e epinefrina, demonstraram ser capazes de inibir a formação das fibras de α -sin, apesar do seu mecanismo de acção não ser totalmente compreendido.¹⁴

Baseados na observação que o antibiótico rifampicina (**1.1**, **Figura 1.5**) inibia a agregação da proteína A-beta,¹⁵ Li e colaboradores¹⁶ estudaram as suas propriedades como inibidor da fibrilhogénese da α -sin, *in vitro*. Estes investigadores confirmaram que a rifampicina (**1.1**) inibe também a agregação da α -sin, maioritariamente através das

suas formas oxidativas. Deste modo, a rifampicina pode ser um potencial agente terapêutico para tratar a DP.¹⁶

A baicaleína (**1.2**, **Figura 1.5**), principal constituinte da erva chinesa *Scutellaria baicalensis*, é um flavonóide antioxidante. Tendo em conta que o stress oxidativo tem um efeito positivo na formação dos agregados de α -sin, Zhu e colaboradores¹⁷ estudaram os efeitos da baicaleína na fibrillogénese da proteína. A formação de filamentos de α -sin foi inibida a concentrações micromolares de **1.2**, especialmente quando usada na forma oxidada. Foi demonstrado que o produto da reacção desta inibição é predominantemente um oligómero solúvel da α -sin, na qual a proteína está covalentemente modificada com uma base de Schiff entre a quinona da baicaleína e a cadeia lateral da lisina da α -sin. Os mesmos investigadores demonstraram que o resíduo da tirosina é importante para a ligação de **1.2** à proteína, uma vez que quando a tirosina é substituída por fenilalanina não se forma essa forma de α -sin modificada.^{17,18} Estudos recentes mostraram também que **1.2** interage com fibras de α -sin, promovendo a sua desagregação.^{8,18}

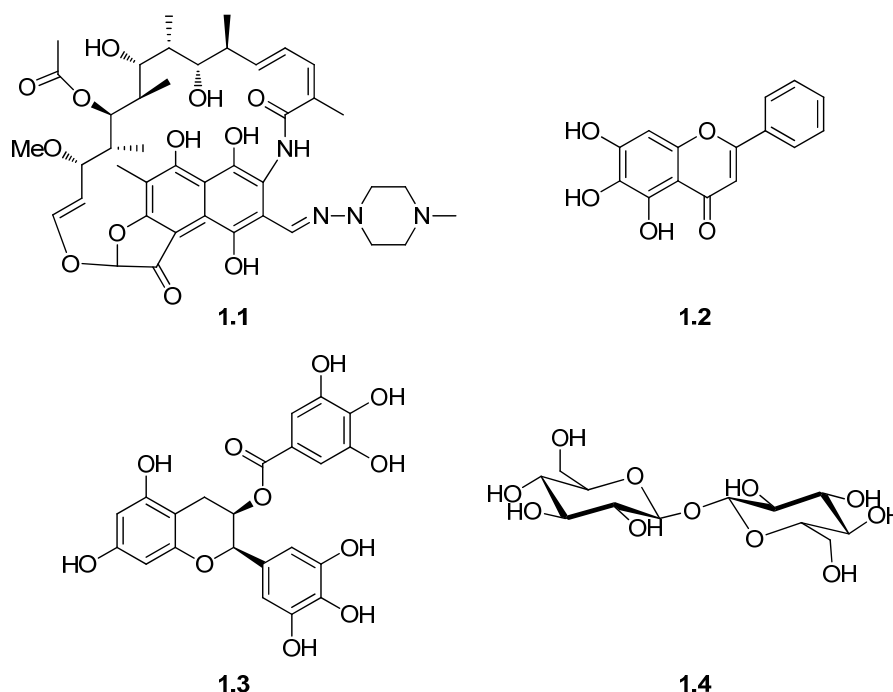


Figura 1.5. Exemplos de pequenas moléculas que interferem com a fibrillogénese da α -sin.

Para além da baicaleína, o efeito de outros polifenóis (como a epigallocatequina galato (**1.3**, **Figura 1.5**), ácido rosmarínico, ácido tânico, catequinas, epi-catequinas) na fibrilhogénese da α -sin foi também estudado.⁸ A partir desses estudos estabeleceu-se uma relação estrutura-actividade para os vários polifenóis naturais. Foi proposto que os aspectos estruturais mais importantes para a inibição e destabilização dos agregados de α -sin são os seguintes: i) presença de estruturas aromáticas na molécula para ligação aos monómeros e/ou oligómeros da α -sin; ii) presença de grupos hidroxilos vicinais no anel do fenil.⁸ Em adição aos polifenóis, outras classes de compostos orgânicos exibiram actividade inibitória na formação de filamentos e fibras de α -sin, como as porfirinas, fenotiazinas, terpenóides, macrólidos poliênicos, vermelho de congo (VC) e derivados.¹⁹

Recentemente, foi reportado que pequenas concentrações de trehalose (**1.4**, **Figura 1.5**) conseguem inibir a agregação dos oligómeros de α -sin mutante (A53T) em fibras maiores. Quando se aumenta a concentração de **1.4**, a formação de oligómeros a partir de α -sin A53T solúvel é também inibida. Como este dissacarídeo apresenta oito grupos hidroxilo activos, propôs-se que a trehalose pode estabelecer pontes de hidrogénio com os átomos de azoto e de oxigénio da proteína, inibindo desta forma a formação de pontes de hidrogénio intra- ou inter-moleculares na α -sin A53T, que ocorre durante o fenómeno de agregação.²⁰

As pequenas moléculas, quando usadas em terapia, têm várias vantagens, para além do seu tamanho reduzido. São relativamente fáceis e económicas de produzir, podem ser administradas oralmente e podem ser facilmente modificadas para se alterar a sua potência ou outras propriedades farmacocinéticas. No entanto, as pequenas moléculas que afectam a fibrilhogénese da α -sin têm a grande desvantagem de não serem selectivas, uma vez que interagem também com outras proteínas amilóide, tais como a β A e a pTau.²¹

Devido à falta de selectividade das pequenas moléculas, vários esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de outro tipo de compostos, nomeadamente pequenos péptidos. Estes compostos são pequenas sequências peptídicas que correspondem parcialmente à sequência da α -sin nativa, mas com pequenas modificações, de modo a impedir que o péptido se auto-agrege. Essas modificações podem ser variadas, nomeadamente substituições na conformação β dos aminoácidos, adição de grupos “bloqueadores” N-

ou C-terminais, substituições de ligações amidas por ésteres, e/ou introdução de aminoácidos α -disubstituídos (ex. ácido α -aminobutírico).²²

El-Agnaf e colaboradores² foram os pioneiros no desenvolvimento de péptidos inibidores da agregação da α -sin. Estes investigadores descobriram que os aminoácidos da região hidrofóbica da α -sin (resíduos 64-100) eram os responsáveis pela auto-agregação, e que heptapéptidos correspondentes aos resíduos 64-86 exibiam uma maior ligação à α -sin. Com base nesses dados, identificou-se a sequência GAVVT (resíduos 68-72 da α -sin) como sendo a região de ligação à α -sin. Foi sintetizada uma biblioteca de péptidos, conhecidos como inibidores da agregação da α -sin (ASI), com a sequência GAVVT, que foram testados em α -sin monomérica. Os estudos *in vitro* indicaram que o péptido RGGAVVTGR-NH₂ (**ASI-1**, **Figura 1.6**) inibia completamente a formação de oligómeros e fibras. Quando testado com oligómeros de α -sin, o ASI-1 inibiu também a auto-agregação em fibras maduras (**Figura 1.7**). Em oposição ao **ASI-1**, o **ASI-4** (RGAVVGR-NH₂) não mostrou qualquer inibição da agregação. No entanto, estes péptidos apresentam uma capacidade limitada de atravessar as membranas celulares e a barreira hemato-encefálica (BHE).²

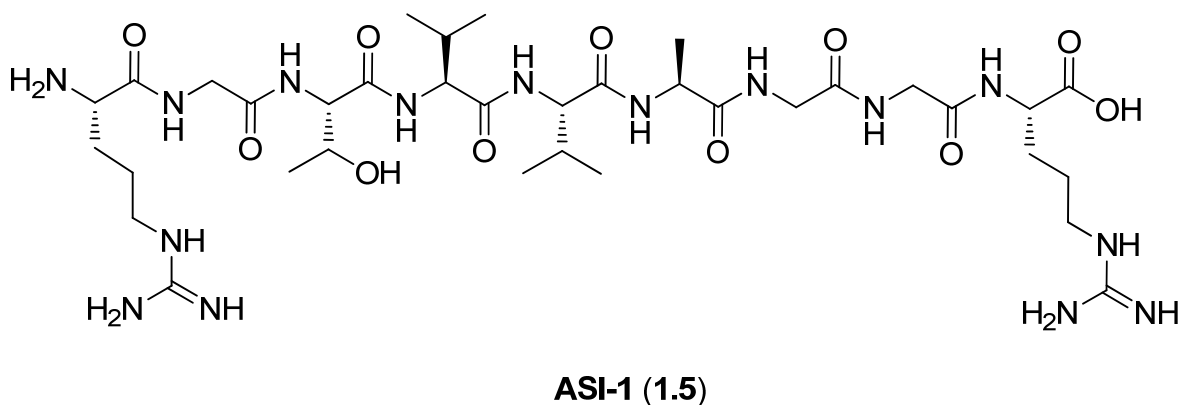


Figura 1.6. Estrutura química do **ASI-1**.

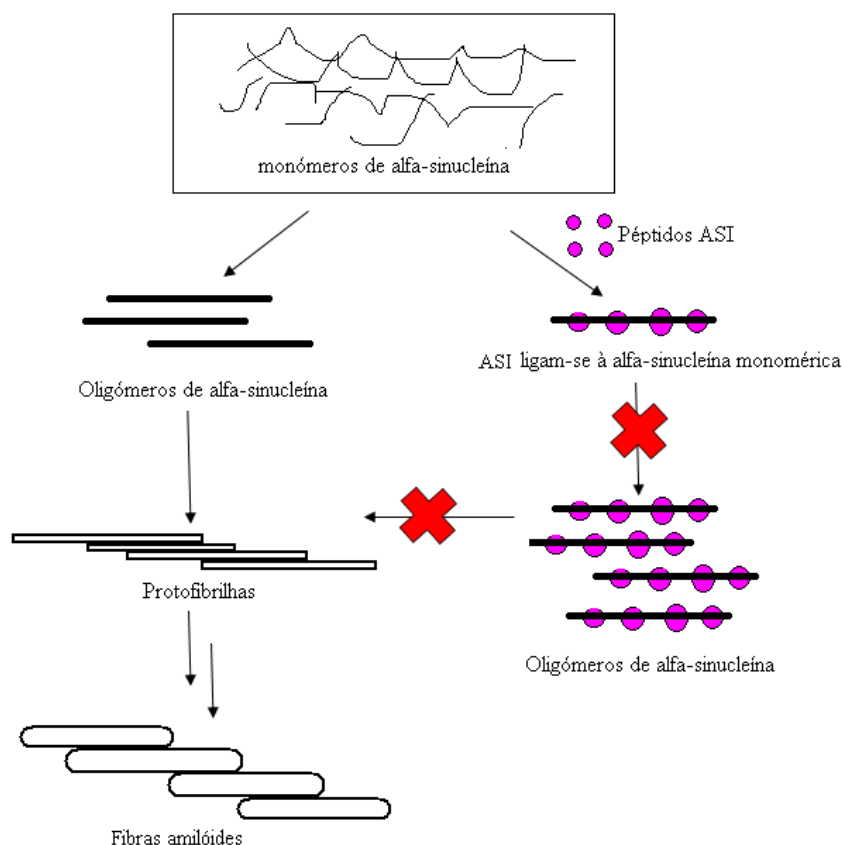


Figura 1.7. Representação esquemática do possível mecanismo de acção dos ASI.

Através de estudos de ressonância magnética e nuclear (RMN) em estado sólido (ssRMN), Madine e colaboradores²² identificaram a região equivalente aos resíduos 77-82 da α -sin (VAQKTV) como sendo a responsável pela auto-agregação da mesma. Baseados nessa informação estrutural, conceberam derivados dessa sequência de péptidos, aos quais introduziram um esqueleto *N*-metilado nos grupos amida, em resíduos alternados. Após análise dos estudos *in vitro* verificaram que o péptido VAQK-TmetilV tem um efeito inibitório considerável na agregação da α -sin.²² Com a substituição do hidrogénio da amida pelo grupo metilo, o péptido é impedido de estabelecer pontes de hidrogénio de um lado, interrompendo a rede de ligações de hidrogénio necessárias à formação das fibras em folha β .^{22,23} Esta estratégia já tinha provado ser eficaz na inibição da agregação da A-beta pelo fragmento péptídico da A-beta (resíduo 25-35).²⁴

Até à data, e apesar da susceptibilidade à degradação proteolítica *in vivo* e a sua limitada permeabilidade através da BHE, os péptidos são, dos compostos direccionados para a α -sin, os mais específicos.²⁵

Para além da investigação com péptidos, a imunoterapia dirigida à α -sin começou também a ser avaliada como uma abordagem para o tratamento de patologias associadas à α -sin. A imunização activa para a α -sin, em ratinhos transgénicos de um modelo da DP, mostrou que nestes a patologia é menos severa em comparação com os tratados com placebo.²⁵

Uma nova classe de compostos orgânicos, os chamados “tweezers” moleculares, ganharam recentemente destaque como potenciais inibidores da fibrillogénese de α -sin. Estes compostos são moléculas com cavidades abertas, capazes de se ligarem a moléculas hospedeiras. A cavidade aberta dos “tweezers” moleculares liga-se às moléculas hospedeiras através de ligações não-covalentes, como pontes de hidrogénio, coordenação com metais, forças hidrofóbicas, ligações de van der Waals, interacções π - π e/ou efeitos electrostáticos. Estes complexos representam uma gama de receptores moleculares macrocíclicos, e a sua estrutura é composta por dois braços que se ligam à molécula hospedeira apenas de um lado, levando a que estes compostos tenham alguma flexibilidade. O conceito de “tweezers” moleculares, que tem vindo a ganhar destaque, abre campos fascinantes no que diz respeito ao reconhecimento molecular, química e biomimética. O comportamento dos “tweezers” moleculares é muito influenciado pela flexibilidade do seu espaçador, colocado entre os dois sítios activos da interacção.²⁶ Um novo “tweezer” molecular, chamado CLR01 (**Figura 1.8**), foi descrito como tendo um efeito benéfico na neurodegeneração provocada pela α -sin, pois inibe a agregação das fibras de α -sin e causa desagregação de fibras pré-formadas. O CLR01 estabiliza ainda os oligómeros pequenos e não tóxicos de α -sin. Este composto também bloqueia a toxicidade das linhas celulares de α -sin e reduz a apoptose neuronal. A toxicidade da α -sin intracelular e extracelular é bloqueada com concentrações de CLR01 semelhantes às necessárias para inibir a agregação da α -sin *in vitro*, o que leva a crer que a protecção das células contra a toxicidade da α -sin é mediada pela inibição da sua agregação. A toxicidade da α -sin *in vivo* também é inibida por este “tweezer” molecular.²⁷

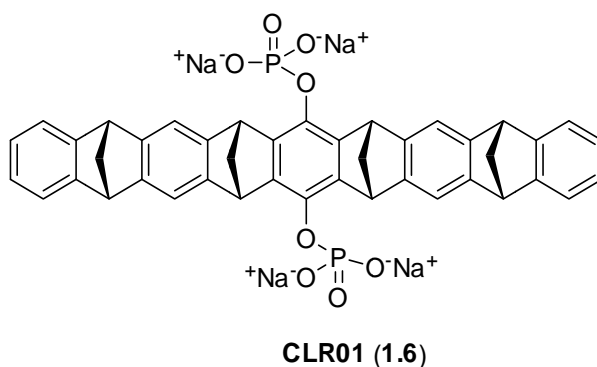


Figura 1.8. Estrutura química do “tweezer” molecular CLR01.

O mecanismo pelo qual o CLR01 inibe o processo de agregação é por interferência com a combinação das interações hidrofóbicas e electrostáticas entre os monómeros de α -sin. Os “tweezers” moleculares exibem elevada afinidade para cadeias laterais da lisina e arginina. Com proteínas ricas em lisina e/ou arginina, estes compostos apresentam uma selectividade extraordinária através de ligações iónicas fosfato-amónio e fosfato-guanidino e interações hidrofóbicas entre a proteína e a cavidade rica em electrões (**Figura 1.9**).²⁸ Como a α -sin é uma proteína rica em lisina (15 resíduos), o CLR01 estabelece ligação com esses resíduos, impedindo sua auto-agregação.²⁹

No entanto, tal como as pequenas moléculas, os “tweezers” moleculares não são específicos para a α -sin. Estes compostos inibem também a agregação de outras proteínas amiloidogénicas, incluído a proteína A-beta, a pTau e polipéptidos amilóides implicados na doença de Alzheimer.²⁸ Apesar dos “tweezers” moleculares estarem a ganhar relevo no que diz respeito à química medicinal, estes compostos ainda representam uma área pouco explorada.²⁶

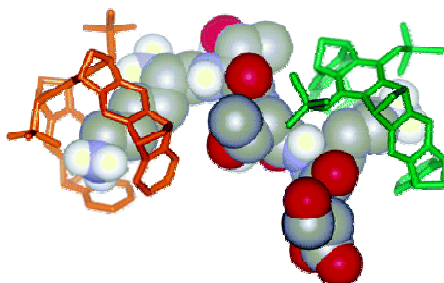


Figura 1.9. Mecanismo de acção dos “tweezers” moleculares (Adaptado de Fokkens e colaboradores²⁸).

1.3.2. Compostos para a visualização de fibras de alfa-sinucleína

Como anteriormente referido, o diagnóstico da DP apenas pode ser confirmado *post-mortem*, através de um exame histopatológico à substância negra pela deteção de LBs. Esse exame consiste na deteção das fibras de α -sin através do uso de corantes, tais como o tioflavina T (ThT) (**1.7**) ou o VC (**1.8**) (**Figura 1.10**). No entanto, estas sondas fluorescentes são usadas apenas *in vitro*, uma vez que não são moléculas neutras e não conseguem atravessar a BHE. Estas sondas fluorescentes reagem com as proteínas amiloidogénicas por intercalação com a estrutura em folha β .

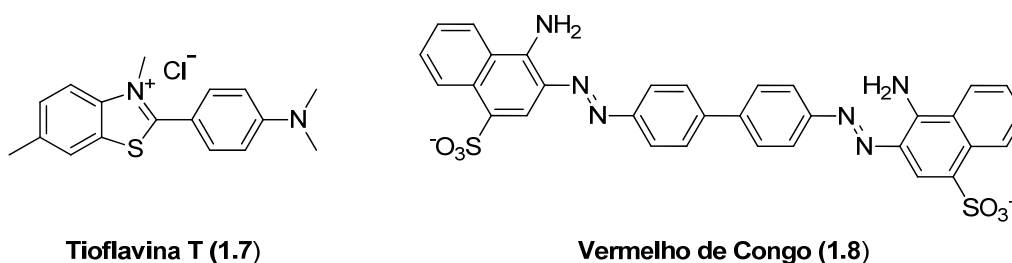


Figura 1.10. Estruturas químicas da tioflavina T e do vermelho de Congo.

Nas últimas décadas tem havido bastante investigação no sentido de desenvolver compostos adequados às técnicas de tomografia de emissão de positrões (PET) e à tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT), para auxiliar na identificação dos processos fisiopatológicos inerentes às doenças neurodegenerativas. Vários estudos mostraram que o PET e o SPECT podem mapear com segurança processos neuroquímicos cerebrais.²⁹ Deste modo, o desenvolvimento de compostos radioactivos, para PET e/ou SPECT, que se liguem especificamente aos LBs e à α -sin, pode ser útil para um diagnóstico precoce de doenças associadas à α -sin, avaliação da progressão da doença e monitorização da eficácia dos tratamentos.² Segundo esta linha de investigação, foram sintetizados vários compostos radioactivos, derivados da ThT e do VC, e avaliados como potenciais sondas moleculares para deteção de estruturas amilóides, por PET e SPECT. Entre esses, o composto [*N*-metil-¹¹C]-2-[4'-(metilamino) fenil] 6-hidroxibenzotiazole (**1.9**, **Figura 1.11**), conhecido como composto de Pittsburgh ([¹¹C]-PIB), mostrou ter uma grande afinidade de ligação às fibras de A-beta.^{13,30} O [¹¹C]-PIB liga-se também à α -sin recombinante, *in vitro*, mas

não se liga aos LBs em amostras *post-mortem*.^{13,31} Outros estudos *in vitro* mostraram que o [¹¹C]-PIB se liga com grande afinidade a homogenados de cérebro com demência de LBs, com uma distribuição semelhante à encontrada em cérebros com Alzheimer, mas menor grau de retenção. Já a ligação do ³H-PIB à α -sin é consideravelmente menor do que a ligação às fibras de A-beta. Estudos posteriores concluíram que a ligação do [¹¹C]-PIB a cérebros com demência de LBs se deve à ligação do composto às placas de A-beta e não à α -sin dos LBs.^{13,32}

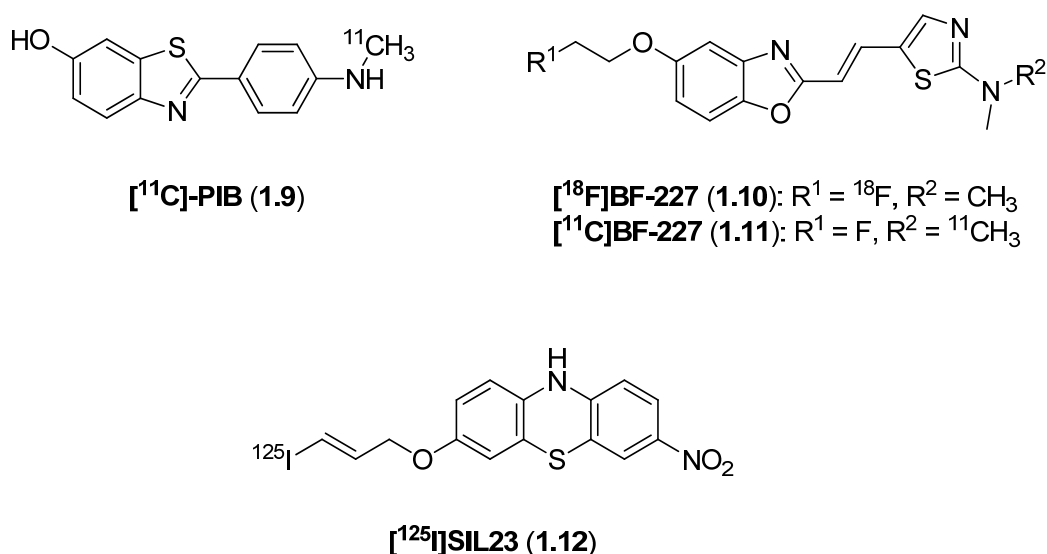


Figura 1.11. Estrutura química de compostos radioactivos com afinidade para a alfa-sinucleína.

O composto [¹⁸F]BF-227 (**1.10**, **Figura 1.11**), inicialmente desenhado como um agente imagiológico para a A-beta, mostrou reconhecer a amilóide de α -sin *in vitro*.³³ Este composto, para além de marcar as placas de A-beta em doentes com Alzheimer, permitiu ainda a visualização dos LBs em cérebros de doentes com DP. Por isso, o [¹⁸F]BF-227 tem sido considerado um biomarcador não selectivo potencialmente útil no estudo da DP. Estudos *post-mortem* mostraram que o [¹⁸F]BF-227 interage com inclusões citoplasmáticas da glia que contêm α -sin.^{29,34} Com base nos resultados promissores obtidos com o [¹⁸F]BF-227 foi sintetizado o composto parente marcado com carbono-11, o [¹¹C]BF-227 (**1.11**, **Figura 1.11**), também para PET. Exames de PET com o [¹¹C]BF-227 permitiram a detecção de depósitos cerebrais de α -sin em doentes com MSA, o que indica que se pode usar este composto para monitorizar a eficácia da terapia da neuroprotecção de α -sin.^{29,33,34}

Recentemente, foi identificado um novo composto para SPECT, o [125 I]SIL23 (**1.12**, **Figura 1.11**), com afinidade para a α -sin. Estudos *post-mortem* indicaram que o [125 I]SIL23 se liga às fibras de α -sin em cérebros de doentes com DP e num modelo animal transgénico de DP. No entanto, a [125 I]SIL23 também mostrou afinidade para a A-beta. Apesar da sua afinidade e selectividade para a α -sin e em relação à A-beta não ser ideal para imagiologia das fibras de α -sin *in vivo*, o [125 I]SIL23 pode ser usado em ensaios competitivos para selecção de ligandos para a α -sin, o que pode ser de extrema utilidade no processo de desenvolvimento de agentes imagiológicos para esta proteína.⁹

O alvo molecular destas sondas imagiológicas não é a sequência da proteína α -sin, mas sim a estrutura secundária genérica em folha β (**Figura 1.3**), que é comum a todas as proteínas amiloidogénicas. Deste modo, uma sonda molecular excelente para a α -sin, para além de ter de exibir uma elevada afinidade para as fibras de α -sin, deve também exibir elevada selectividade para as mesmas. A principal vantagem das pequenas moléculas que interagem com a α -sin é a sua capacidade de atravessar a BHE, quando administradas sistemicamente. Até ao momento não existe um composto radioactivo selectivo para a amiloide da α -sin. Estes dados sugerem a necessidade de desenvolver sondas imagiológicas específicas para a α -sin, o que requer um maior investimento no conhecimento do processo biológico e radioquímico envolvido.¹³

1.4. Péptidos como agentes terapêuticos

A terapia baseada no uso de péptidos é uma área que tem atraído cada vez mais interesse, havendo actualmente um grande número de péptidos já aprovados para comercialização. As aplicações terapêuticas dos péptidos variam, podendo ser usados no tratamento de cancro, dor, inflamação, diabetes, entre outras.³⁵ A facilidade de síntese de péptidos e um aumento do conhecimento da biologia molecular tem contribuído para uma maior aplicação clínica de péptidos terapêuticos.³⁶

Quando os péptidos são concebidos como agentes terapêuticos é necessário considerar alguns aspectos importantes, como a estabilidade proteolítica, a permeabilidade através das membranas celulares e BHE, e a especificidade. A estabilidade às proteases depende da estrutura do péptido e pode ser aumentada pela substituição de alguns aminoácidos naturais por D-aminoácidos, extensões de lipofilia e ciclização peptídica.³⁶

Os péptidos têm um papel importante no sistema nervoso central (SNC), uma vez que os neuropéptidos, tal como alguns aminoácidos (ex. glicina e glutamato), representam uma grande classe de substâncias transmissoras. A acção dos neuropéptidos é mediada pela sua ligação a receptores de membrana específicos. A maioria desses receptores pertence aos receptores acoplados à proteína G, e consistem numa cadeia polipeptídica única, com sete domínios transmembranares, um domínio extracelular com o sítio de ligação ao ligando, e um domínio intracelular ligado às proteínas-G, que conduz à activação de segundos mensageiros e internalização.³⁷

A utilização de péptidos como agentes terapêuticos para o tratamento de doenças neurodegenerativas é um objectivo importante.^{38,39} Contudo, a permeabilidade dos péptidos através da BHE é um factor limitante. Para além de algumas proteínas, tais como a tranferrina, a lactoferrina e lipoproteínas de baixa intensidade que atravessam a BHE por um processo de endocitose mediada por receptores específicos, poucas moléculas grandes e hidrofílicas conseguem chegar ao cérebro. Esta é a principal dificuldade no desenvolvimento de péptidos para doenças neurodegenerativas e para a dor.⁶

1.4.1. Transporte de péptidos através da barreira hemato-encefálica

A BHE é uma barreira que separa o cérebro do sistema circulatório. Esta barreira tem a função de proteger o SNC de compostos químicos potencialmente prejudiciais através da regulação do transporte de moléculas.³⁹

A BHE é composta por células endoteliais que revestem os capilares cerebrais e estão ligadas por extensas junções apertadas. Assim, estes capilares não têm pequenos poros que permitam o movimento rápido de solutos da circulação para outros órgãos. Consequentemente, a BHE apenas é permeável a pequenas moléculas solúveis em lípidos que atravessam o cérebro por difusão passiva, entre as células e/ou através das células.³⁹ As restantes moléculas podem atravessar o cérebro através de transportadores (ex. aminoácidos e pequenos péptidos) ou receptores específicos, que se encontram quer na face luminal quer na abluminal da barreira, ou por endocitose mediada por adsorção.⁶ A BHE tem também uma função metabólica, já que os compostos que atravessam a

membrana são expostos a enzimas degradantes, presentes em grande quantidade nas células endoteliais, que contêm uma grande densidade mitocondrial, e são organelos metabolicamente muito activos.¹⁶ O transporte dos péptidos pela BHE é ainda mais complexo do que as restantes drogas, uma vez que estes podem ser rapidamente inactivados pelas peptidases ubíquas.^{38,39}

Para ultrapassar a permeabilidade limitada na BHE da grande maioria dos compostos, várias estratégias têm sido exploradas. Em relação a compostos de natureza peptídica, uma das estratégias para aumentar a biodisponibilidade no cérebro é aumentar o tempo de semi-vida do péptido no plasma, quer através do aumento da sua estabilidade metabólica, quer pela diminuição da excreção no plasma e no cérebro. A estabilidade metabólica e a excreção podem ser melhoradas com a inibição das enzimas proteolíticas.⁴⁰

Embora a maneira mais eficaz de transportar péptidos pela BHE seja através de transportadores ou por internacionalização dos receptores nos capilares neuronais, a via mais simples consiste em aumentar a sua difusão passiva (isto é, o aumento da lipofilia dos péptidos). Este método continua a ser o mais viável para aumentar a captação de compostos no cérebro.⁴⁰ A lipofilia pode ser aumentada pela redução do potencial de formação de pontes de hidrogénio e/ou pela adição de grupos lipofílicos. A conjugação de halogéneos ao péptido e a acilação ou alquilação do N-terminal podem também aumentar a lipofilia.⁴¹ Fármacos muito lipofílicos tendem a ligar-se extensivamente ao plasma, e podem aumentar a afinidade para os transportadores da BHE, levando a um sequestro intra-endotelial e transporte rápido para a periferia.⁴⁰

Outra das estratégias exploradas é o uso de vectores de transporte, que envolvem a conjugação do péptido a uma molécula/substância alvo, a qual tem afinidade para as características ou receptores do BHE, resultando maioritariamente em absorção ou recepção mediada por endocitose. Os vectores que têm sido mais usados são a albumina cationizada, lipossomas, nanopartículas e conjugação a anticorpos monoclonais para receptores como o da transferrina, que é expresso na BHE em níveis superiores aos restantes.⁴⁰ Também se pode tentar uma estratégia em que a unidade peptídica que tem de chegar ao cérebro é disfarçada, como se fosse parte de uma molécula volumosa dominada por grupos lipofílicos modificados, que dirigem a penetração na BHE e

previnem o reconhecimento pelas peptidases. Esta estratégia já foi eficazmente usada anteriormente.³⁹

Tendo em conta que a BHE apresenta uma expressão elevada do transportador de glucose endógeno (GLUT1), pois o cérebro necessita de cerca de 30% da glucose total do organismo, a glicosilação de péptidos aumenta significativamente a sua passagem pela BHE, com a vantagem de aumentar também a sua estabilidade.^{6,40,41} Deste modo, os glicopéptidos atravessam a BHE pelo GLUT1. Esta abordagem provou ser eficiente no transporte de glicopéptidos análogos de encefalinas.⁴⁰

As estratégias que facilitam a passagem de substâncias químicas pela BHE podem, então, permitir a chegada de neurofármacos, incluindo neuropéptidos, ao cérebro, de modo não invasivo e sustentado.³⁹

1.5. Fluorescência

Nos últimos anos, a importância e uso da microscopia e imagiologia de fluorescência tem vindo a aumentar, devido à maior facilidade de acesso a proteínas fluorescentes, corantes e sondas que permitem estudos não invasivos da expressão genética, função das proteínas, interações entre proteínas e um grande número de processos celulares. Tem também aumentado a lista de técnicas imagiológicas fluorescentes com resolução microscópica e vídeos, e de métodos que actuam em resoluções para além do limite de difracção e oferecem elevada sensibilidade, aumentando a capacidade de percepção da biologia molecular. A imagiologia com fluorescência macroscópica tem-se destacado como método de imagiologia molecular para estudar tecidos de pequenos animais, uma vez que a luz propaga-se através de alguns centímetros de tecido no infra-vermelho (IV).⁴²

As pequenas sondas moleculares são ferramentas indispensáveis na química biológica, sendo úteis como biomarcadores de moléculas, substratos enzimáticos, indicadores ambientais e agentes de coloração celular.⁴³ A ligação aos vários grupos reactivos, componentes quelantes, substratos e outras entidades químicas dos vários núcleos fluorescentes origina as várias sondas. Essas sondas são bem conhecidas, e consistem

em moléculas com características espectrais, grande estabilidade química e fotoquímica, e síntese fácil. A escolha da sonda fluorescente a usar pode ser difícil, dado a grande variedade disponível. Contudo, as sondas disponíveis têm uma modularidade inerente. A percepção das propriedades dos compostos fluorescentes facilita a escolha e concepção da sonda.⁴⁴

O processo de fluorescência inicia-se quando uma molécula, no estado fundamental (S_0), absorve a energia de um fóton, o que faz com que os electrões se desloquem para orbitais de maior energia, passando para o estado excitado (S_1). O electrão pode voltar ao estado fundamental, havendo libertação da energia em excesso, com emissão de fótons (por exemplo, fluorescência) ou de maneira não-radiativa. Este processo ocorre em menos de 0.00001 segundos.⁴⁵

Quando se avalia um fluoróforo há vários aspectos a ter em conta, nomeadamente a absorção máxima (λ_{max}) e a emissão máxima (λ_{em}), que representam o pico máximo no espectro de absorção e emissão, respectivamente. O comprimento de onda da emissão máxima (λ_{em}) é maior que o λ_{max} , devido à perda de energia na reorganização do solvente ou outros processos. A diferença entre o λ_{em} e o λ_{max} é designada de deslocação de Stokes (**Figura 1.12**).⁴⁵ Outro parâmetro importante num fluoróforo é o coeficiente de extinção (ϵ), que correlaciona a quantidade de luz absorvida, num dado comprimento de onda, com a concentração do fluoróforo em solução.⁴⁶

Fluoróforos com pequenos valores de deslocação de Stokes são susceptíveis de se auto-extinguirem (*quenching*) por transferência de energia, o que limita o número de espécies que se podem acoplar à biomolécula. O tempo em que a molécula está no estado excitado (τ) e a razão dos fótons de fluorescência com os absorvidos (ϕ) são parâmetros essenciais num fluoróforo, pois são importantes na comparação de diferentes moléculas fluorescentes. O brilho de um fluoróforo ($\epsilon \times \phi$) inclui a quantidade de luz absorvida e a razão da eficiência do fluoróforo e, portanto, na comparação de diferentes sondas estes dados devem ser considerados. Na **figura 1.13** estão listadas algumas das sondas fluorescentes mais usadas.⁴⁷



Figura 1.12. Deslocação de Stokes (Adaptado de ^{44,45,46}).

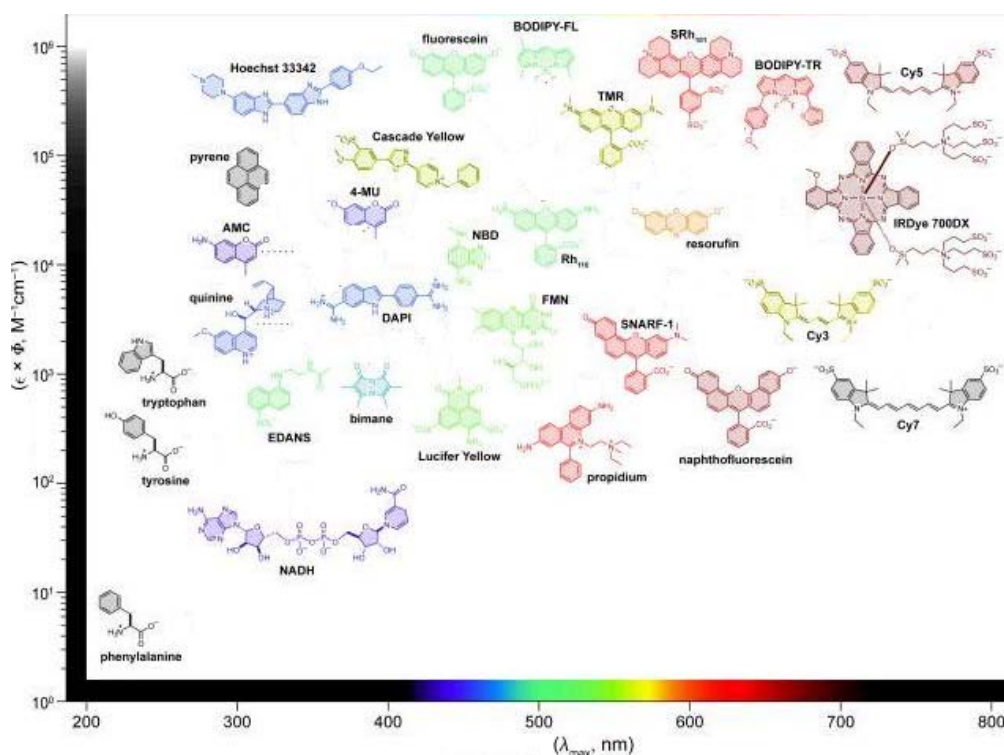


Figura 1.13. Sondas fluorescentes mais comuns.⁴⁷

Um dos agentes fluorescentes mais usado é a fluoresceína e seus derivados, tais como os isotiocianato de fluoresceína (FITC). A FITC tem um comprimento de onda máximo de excitação e emissão de aproximadamente 495nm e 521 nm, respectivamente. A maioria das estratégias de acoplamento da FITC a biomoléculas envolve a reacção do grupo isotiocianato da FITC com um destes nucleófilos: aminas, grupos sulfidrilos ou iões fenolato de resíduos de tirosina.⁴⁸

Síntese de péptidos análogos do
ASI-1

2. Síntese de péptidos análogos do ASI-1

A relevância que a α -sin adquiriu nos últimos anos na compreensão das doenças neurodegenerativas não foi acompanhada pelo desenvolvimento de compostos capazes de interagir com esta proteína. Tendo em conta que a α -sin, quando sofre agregação, adquire uma estrutura idêntica à de outras proteínas amilóides, ainda não foi identificado um composto que interactue selectivamente com estes agregados. Tais compostos, quando acoplados a um radionuclídeo, terão um papel fundamental na visualização *in vivo* dos agregados de α -sin por técnicas nucleares de imagiologia molecular não invasiva (**Figura 2.1**).

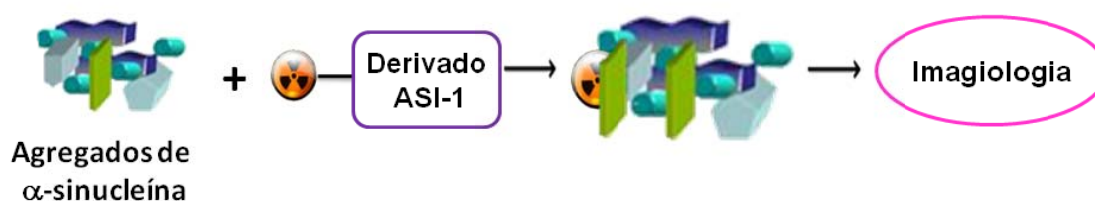


Figura 2.1. Análogos de ASI1 como agentes imagiológicos para a detecção *in vivo* de agregados de α -sin.

A visualização, *in vivo*, dos agregados de α -sin permitirá:

- estudar os mecanismos que envolvem a α -sin no desenvolvimento das sinucleinopatias;
- identificar os pacientes que podem vir a desenvolver DP ou demência associada aos LBs, e dessa forma contribuir para um diagnóstico precoce;
- monitorizar a eficácia de estratégias terapêuticas no tratamento da DP, nomeadamente as baseadas na dissolução de agregados de α -sin já existentes.

2.1. Objectivos do trabalho

Uma vez que ainda não existe uma sonda molecular específica para os agregados de α -sin, surge a necessidade de identificar e sintetizar novos compostos capazes de interagir com os mesmos. A descoberta de uma pequena família de péptidos (análogos de **ASI-1**) que tem a capacidade de promover a inibição da agregação e/ou a desagregação da α -sin² constituiu o ponto de partida para desenvolver compostos selectivos para os agregados de α -sin.

O objectivo deste trabalho consiste em sintetizar uma biblioteca de péptidos análogos de ASI-1 e avaliar o interesse desses derivados como agentes específicos da α -sin. Assim, pretende-se sintetizar:

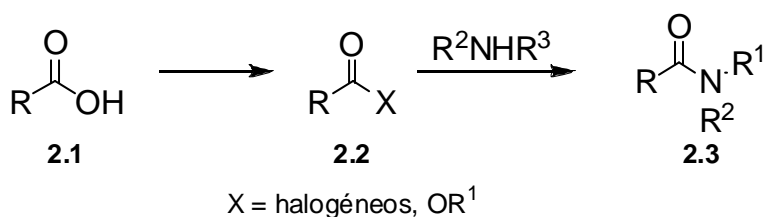
- Os péptidos ASI-1 e o ASI-4. Estes dois péptidos, já descritos, serão utilizados como controlo positivo e negativo na avaliação dos análogos do ASI-1;
- Análogo ASI-1 contendo um grupo 4-fluorobenzoíl. Com este análogo determinar-se-á a influência do grupo fluorado, quer na estabilidade metabólica, quer na interacção do análogo com a α -sin. A introdução deste grupo nos análogos ASI-1 permitirá caracterizar os compostos parentes radiofluorados, e determinar se estes análogos têm interesse para visualização *in vivo* de agregados de α -sin;
- Análogo ASI-1 contendo um grupo 4-fluorobenzoíl e um resíduo de glucose. Este péptido foi concebido na tentativa de aumentar a capacidade do análogo atravessar a BHE;
- Análogo ASI-1 contendo um grupo 4-fluorobenzoíl e uma sonda fluorescente. A fluorescência deste péptido será explorada para estudo da ligação do análogo a agregados de α -sin e como sonda dual de α -sin;
- Análogos ASI-1 funcionalizados no N-terminal e com a ϵ -amina do resíduo da lisina livre, e por isso considerados precursores dos péptidos radiofluorados.

Estes péptidos serão o ponto de partida para o estudo dos análogos ASI-1 e para estabelecer o seu uso como agentes de agregados de α -sin.

2.2. Formação da ligação amida

A formação de ligações amida é uma das reacções mais importantes, já que as amidas são constituintes importantes em vários químicos, fármacos, intermediários químicos, polímeros, e biopolímeros. Estas ligações têm também um papel crucial em sistemas biológicos, constituindo as ligações peptídicas entre os aminoácidos nos péptidos e proteínas.⁴⁹

As ligações amida são formadas a partir da condensação de aminas com ácidos carboxílicos com eliminação de uma molécula de água. Normalmente estas condensações são conseguidas pela activação do ácido, quer convertendo-o num cloreto de acilo, em anidrido, em *N*-succinimidina, quer através de reagentes de acoplamento (**Esquema 2.1**).^{49,50}



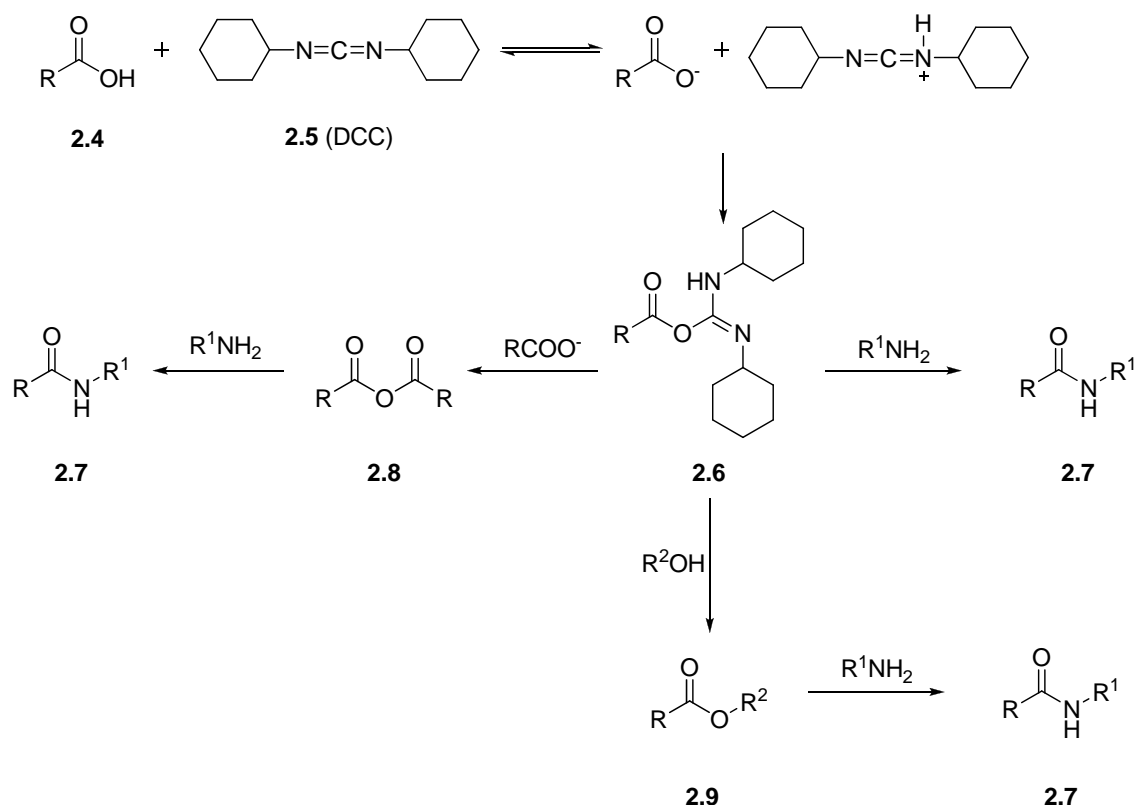
Esquema 2.1. Activação do ácido carboxílico para a formação da ligação amida.

Recentemente foram desenvolvidos outros métodos para a formação de ligações amida, tais como a reacção de ácidos carboxílicos com isonitrilos⁵¹ ou isocianatos,⁵² ácidos tiocarboxílicos com azidas,⁵³ ou o acoplamento oxidativo de bromonitroalcanos com aminas.⁵⁴ Entre os reagentes de acoplamento, os mais usados são as carbodiimidas,⁴⁹ *N,N*-carbonildiimidazolo,⁴⁹ cloreto difenilfosfónico,⁴⁹ *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1 *H*-benzotriazol-1-il) urónio hexafluorofosfato (HBTU),⁵⁵ entre outros.

Quando são usadas carbodiimidas (ex. *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC)) como reagentes de acoplamento na activação dos ácidos carboxílicos, forma-se o *O*-acilisourea **2.6** como intermediário (**Esquema 2.2**). Este intermediário pode reagir com vários grupos funcionais:⁴⁹

- Aminas, em que o ácido é activado *in situ*, com formação da amida **2.7**;

- Ácidos carboxílicos, com formação do anidrido **2.9**, que por sua vez reage com os grupos amina conduzindo à formação de uma amida;
- Álcoois (ex. 1-hidroxibenzotriazolo (HOBt)) ou fenóis (ex. tetrafluorofenol, *p*-nitrofenol) contendo grupos atratores de electrões, com formação do éster activado **2.9**. Este éster activado é bastante reactivo com grupos amina.



Esquema 2.2. Representação da activação de ácidos carboxílicos com DCC.

2.3. Síntese de péptidos

Os péptidos são biomoléculas que têm dois ou mais resíduos de aminoácidos ligados entre si. Têm tido bastante interesse como fármacos, especialmente devido à sua actividade biológica elevada, elevada especificidade e baixa toxicidade. O desenvolvimento de estratégias robustas de síntese de péptidos contribuiu bastante para a consolidação deste tipo de compostos em biologia.⁵⁶

As metodologias aplicadas na síntese peptídica envolvem:⁵⁶

- Síntese química - a ligação peptídica forma-se por condensação de reagentes químicos;
- Síntese enzimática/biocatalisada - a formação da ligação peptídica é catalisada por enzimas;
- Síntese por DNA recombinante - baseia-se na utilização de técnicas de clonagem e de maquinaria ribossomal de sistemas biológicos, que codificam a formação das ligações peptídicas.

A síntese química caracteriza-se pelo uso de reagentes químicos que activam o grupo carboxilo de um aminoácido dador do grupo acilo para formar a ligação peptídica, após sofrer o ataque nucleofílico do grupo amino de um segundo aminoácido. Esta metodologia permite usar aminoácidos comerciais (naturais e não-naturais) e aminoácidos modificados, sendo fundamental a protecção das cadeias laterais reactivas dos aminoácidos.⁵⁶

A síntese peptídica química pode ser realizada em solução ou em fase sólida. Na síntese clássica, em solução, cada acoplamento e desprotecção são acompanhados pela purificação e caracterização do produto formado. Cada purificação pode requerer extracção, lavagem, precipitação, cristalização, filtração, centrifugação, cromatografia e/ou secagem. Este tipo de síntese é bastante usado para preparar péptidos em grande escala. A síntese peptídica em fase sólida, por ser mais prática, é a mais usada. O fundamento desta metodologia é o uso de um suporte polimérico, no qual se ligam sequencialmente resíduos de aminoácidos, até formação do péptido desejado.⁵⁶

2.3.1. Síntese de péptidos em fase sólida

A síntese peptídica em fase sólida (SPPS) é baseada na adição sequencial de um aminoácido, com os grupos α -amino e da cadeia lateral protegidos, a um suporte polimérico insolúvel. Após desprotecção do grupo α -amino, o próximo aminoácido é adicionado. Este procedimento repete-se até adição do último resíduo da sequência peptídica (**Figura 2.2**). Por fim, o peptidil-resina é clivado, obtendo-se o péptido com o grupo carboxílico terminal livre ou amidado, consoante o suporte polimérico escolhido.

O agente de clivagem também pode remover os grupos protectores das cadeias laterais dos aminoácidos (**Figura 2.2**). A SPPS pode ser realizada manualmente ou num sintetizador automático.^{55,56}

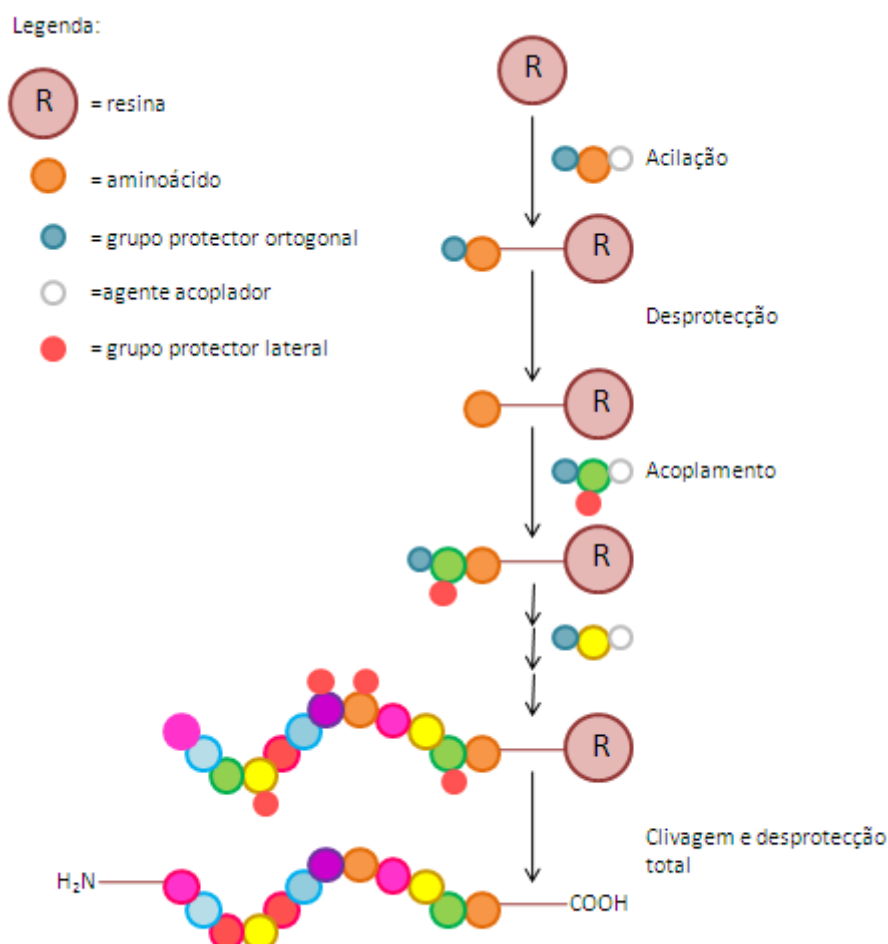


Figura 2.2. Representação esquemática da SPPS.

Para a protecção do grupo α -amino dois grupos protectores podem ser usados: o grupo *t*-butiloxicarbonilo (Boc) ou do grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc). Na estratégia Boc o grupo α -amino dos dadores de acilo está protegido com o grupo *t*-butiloxicarbonilo e é lábil ao ácido trifluoroacético (TFA), enquanto que na estratégia Fmoc este grupo, lábil a bases, é removido com uma solução de piperidina a 20% em dimetilformamida (DMF). A estratégia do Fmoc apresenta a vantagem de permitir uma desprotecção selectiva preservando os grupos protectores das cadeias laterais e a ligação peptidil-resina. Em contraste, na estratégia Boc o uso de TFA para a sua hidrólise é

problemático, pois pode promover a desprotecção dos grupos protectores das cadeias laterais e a quebra da ligação peptidil-resina. Por isso, a desprotecção é conseguida com o uso de HF, que é extremamente tóxico e requer equipamento laboratorial específico.^{55,57}

A principal vantagem da SPPS é a rapidez e facilidade de purificação. Como a resina é insolúvel em solventes orgânicos, o péptido em formação também é insolúvel e, por isso, pode ser facilmente purificado por filtração. Deste modo, as reacções de acoplamento podem realizar-se com excesso de aminoácido, e as lavagens entre os acoplamentos removem os reagentes e produtos solúveis em excesso, realizando-se uma rápida purificação parcial em cada etapa do processo, sem necessidade de isolar o produto obtido, como no caso da síntese em solução.⁵⁷ As desvantagens deste método são a possibilidade de reacções incompletas, modificações químicas das cadeias laterais que levam à formação de sub-produtos e a ocorrência de racemização devido à necessidade de activar o α -carboxilo dos aminoácidos em meio básico.⁵⁷⁻⁵⁹

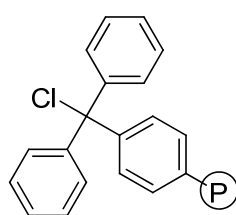
O acoplamento dos aminoácidos requer a prévia activação da sua função carboxílica. Quando se escolhe o activador deve-se ter em conta aspectos como a facilidade de utilização, rapidez de reacção e ausência de reacções secundárias. O HBTU é um dos activadores mais usados pois limita a enantiomerização. O HOBt é bastante usado para suprimir a racemização de moléculas quirais, e aumentar a eficiência da síntese peptídica. Quer o HBTU quer o HOBt são reagentes de activação *in situ*, usados para produzir o éster activado que depois reagirá com a amina do peptidil-resina.⁴⁹

2.3.2. Suporte sólido

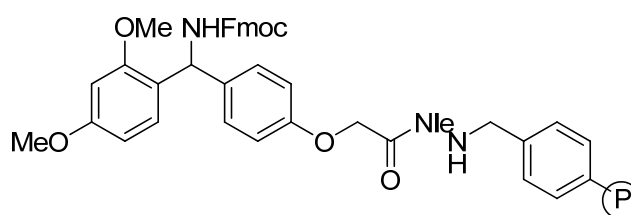
O suporte sólido usado na SPPS é uma resina, que deve ser estável e insolúvel nos solventes usados na síntese peptídica. Para além disso, deve ter um grupo funcional que permita ligar o primeiro aminoácido da sequência.⁵⁵

A escolha da resina é determinante na síntese peptídica e baseia-se fundamentalmente no tipo de ligação ao primeiro resíduo da sequência peptídica. Existe um número elevado de suportes sólidos disponíveis, no entanto, as resinas podem ser divididas em três categorias principais, consoante o grupo funcional reactivo: resinas baseadas no

grupo hidroximetilo-, no cloreto de tritilo- (**2.10**) e no aminometilo- (**2.11**) (**Figura 2.3**). As resinas do tipo hidroximetil e aminometil ligam-se ao carboxilo do primeiro aminoácido. As resinas do tipo cloreto de tritilo permitem também a ligação aos grupos hidroxil ou mercapto das cadeias laterais reactivas. Desta forma, quando se usa uma resina do tipo cloreto de tritilo ou hidroximetilo, após hidrólise do peptidíl-resina, o C-terminal do péptido está na forma de ácido carboxílico. Por outro lado, quando se pretende um péptido com uma C-carboxamida terminal usa-se uma resina do tipo Rink Amide.⁶⁰



2.10



2.11

Figura 2.3. Exemplos de suportes sólidos: Cloreto de tritilo (**2.10**); Rink Amide MBHA (**2.11**); P = matriz de poliestireno.

Os péptidos que apresentam o C-terminal na forma de carboxamida têm uma maior estabilidade metabólica ao ataque das proteases em relação aos péptidos com o grupo carboxilo livre.⁵⁶

No trabalho realizado nesta tese a resina usada foi a Rink Amide MBHA. Esta resina tem a particularidade de ser mais estável a pequenas concentrações de TFA, comparativamente à Rink Amide, e permite a desprotecção selectiva de grupos protectores das cadeias laterais (por exemplo, grupo metiltritil (Mtt) do resíduo de lisina) sem hidrolisar o peptidíl-resina.⁵⁵

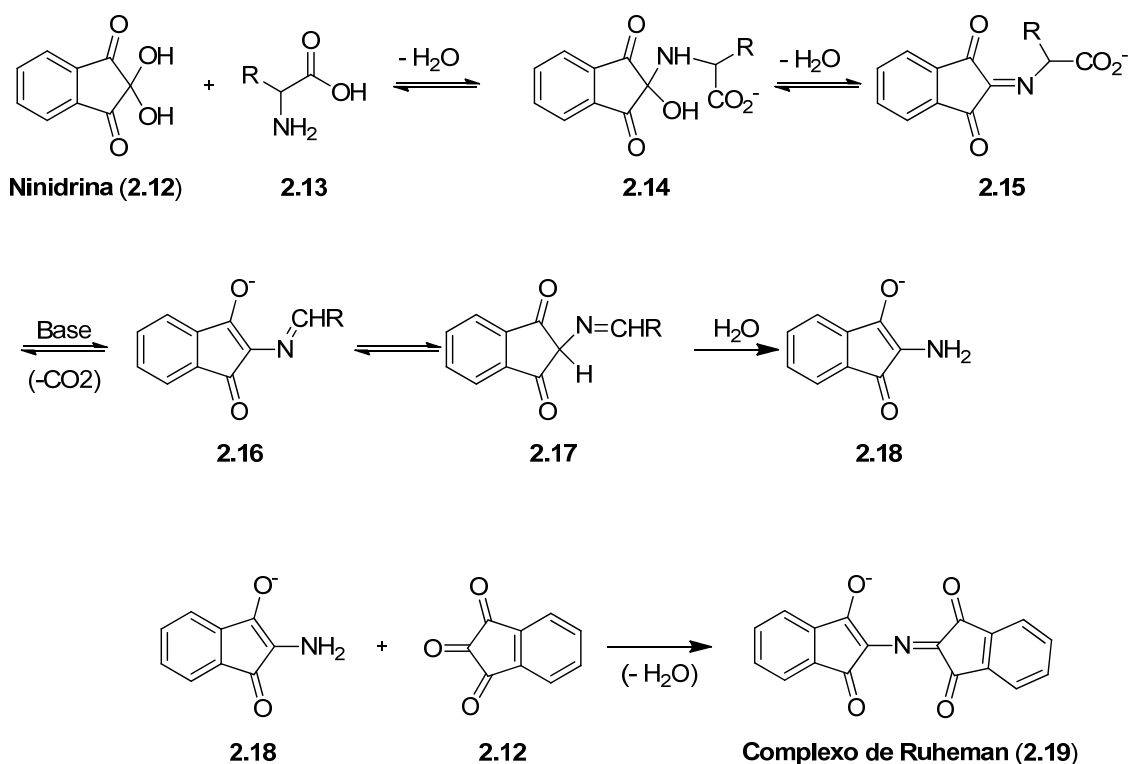
Existem várias misturas de solventes para a clivagem dos suportes poliméricos.^a A Rink Amide MBHA sofre clivagem com uma solução de TFA em água, e triisopropilsilano (TIS) como agente sequestrante (95:2.5:2.5 v:v:v). Durante a hidrólise da resina e dos grupos protectores são geradas espécies catiónicas reactivas que podem reagir e modificar os aminoácidos da sequência peptídica que tenham grupos funcionais dadores

de electrões. Os agentes sequestrantes têm como função evitar estas reacções secundárias.⁵⁵

2.3.3. Teste de Kaiser

Quando a síntese dos péptidos se realiza manualmente é necessário monitorizar os acoplamentos, bem como as desprotecções. Esta monitorização é realizada através do teste de Kaiser (teste de ninidrina). O teste de Kaiser consiste em testar uma pequena porção de peptidil-resina com uma solução de 5% ninidrina em etanol, 80% fenol em etanol e KCN em piridina (2 mL 0.001M KCN em 98 mL piridina), seguido de aquecimento.⁵⁶

Este teste baseia-se no aparecimento da coloração azul quando o α -aminoácido está desprotegido (**Figura 2.4-A**). Esta coloração deve-se à formação do complexo de Ruheman (**Esquema 2.3**).⁶¹



Esquema 2.3. Mecanismo de reacção de α -aminoácidos com hidrato de ninidrina para formar o complexo de Ruheman (2.19).⁶¹

Caso a α -amina esteja protegida, o peptidil-resina apresenta um tom mais escuro, acastanhado (**Figura 2.4-B**).^{56,61}

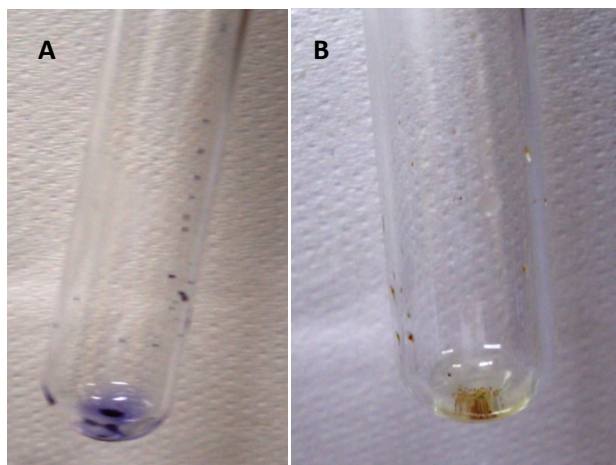


Figura 2.4. Teste Kaiser. A- Resultado positivo para desprotecção da α -amina; B- Resultado positivo para acoplamento entre aminoácidos.

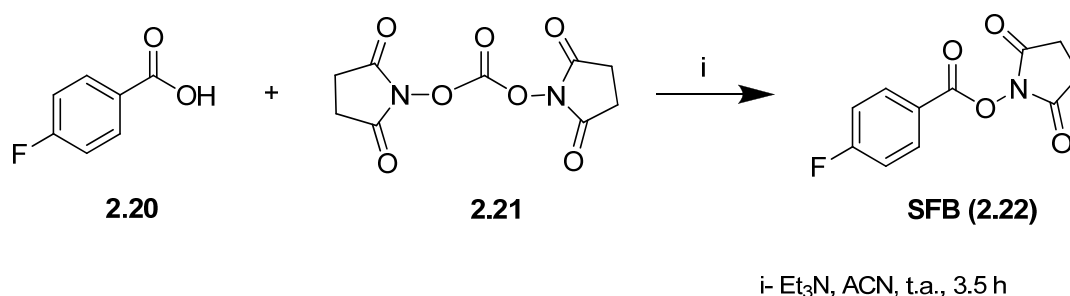
2.4. Resultados e Discussão

O objectivo principal do trabalho descrito nesta tese foi a preparação de novos análogos fluorados do péptido **ASI-1**. Tal como descrito em 2.1, esses análogos consistem na introdução do grupo 4-fluorobenzoíl na amina da cadeia lateral do resíduo da lisina. Esta estratégia está em conformidade com a utilização do ^{18}F -succinimidil benzoato (^{18}F -SFB) como grupo prostético para a marcação de péptidos com flúor-18. Numa primeira abordagem decidiu preparar-se o congénere ^{19}F -SFB para posterior conjugação à lisina.

2.4.1. Activação do ácido 4-fluorobenzoíco

A síntese do SFB (**2.22**) foi realizada através da reacção do ácido 4-benzoíco (FBA) (**2.20**) com o carbonato *N,N*-disuccinimidil (**2.21**) na presença de trietilamina como base (**Esquema 2.4**), tal como descrito na literatura.⁶²

Controlou-se a reacção por cromatografia em camada fina (TLC) e observou-se que, com o prolongamento do tempo de reacção, a intensidade da mancha correspondente a **2.22** diminuía. Isto deveu-se ao facto de o produto **2.22** ser susceptível a hidrólise em solução, conduzindo à re-formação de **2.20**. Terminou-se a reacção antes de o ácido **2.20** ter sido completamente consumido. Nas mesmas condições de estequiometria e de tempos de reacção, os rendimentos de **2.22** foram menores à medida que se aumentou a quantidade de ácido **2.20** (**Tabela 2.1**).



Esquema 2.4. Síntese do SFB (2.22).

Table 2.1. Relação quantidade FBA/rendimento **2.22.**

FBA	SFB
100 mg	147 mg (87%)
300 mg	328 mg (65%)
500 mg	475 mg (56%)

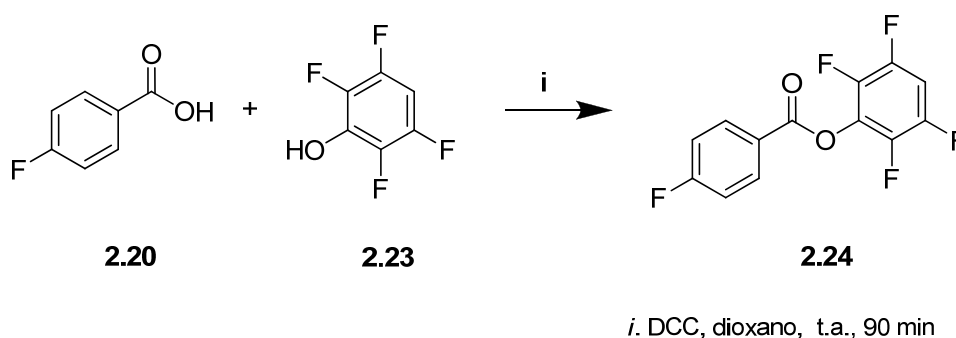
O composto SFB foi caracterizado por RMN de ^1H , de ^{13}C , e de ^{19}F . No espectro de RMN de ^1H observou-se o singuleto correspondente aos prótons homotópicos do succinimidil a 2.93 ppm. Tal como no FBA, os picos correspondentes aos prótons aromáticos em **2.22** encontram-se acoplados entre si (3J) e ao átomo de flúor-19 (3J e 4J). Estes prótons apresentam-se na forma de duplos dupletos, porque como o ^{19}F tem um spin de $\frac{1}{2}$, a multiplicidade do acoplamento dos prótons H^{2+6} e H^{3+5} com o flúor aparece na forma de duplete. Para além disso, foi possível distinguir H^{2+6} e H^{3+5} com base na diferença entre as constantes de acoplamentos $^3J_{\text{H-F}}$ e $^4J_{\text{H-F}}$. Os H^{2+6} apresentam uma $^4J_{\text{H-F}}$ de 5.4 Hz, enquanto que os H^{3+5} apresentam uma constante maior ($^3J_{\text{H-F}} = 8.7$

Hz). No espectro de RMN de ^{13}C foi também observado o sinal correspondente aos carbonos homotópicos do grupo succinimidil a 25.59 ppm. A 162.97 ppm surge um duplete, correspondente ao carbono na posição *para* em relação ao éster, que por estar ligado a um átomo muito electronegativo (flúor) surge a campos mais baixos.

A tentativa de caracterizar o composto **2.22** por espectrometria de massa (MS) foi inconclusiva. O facto de o SFB ser um éster e não ter um protão ácido torna difícil a sua irradiação e aquisição do valor de massa por Ionização de Electrospray (ESI).

Deste modo, para comprovar a existência da função éster o produto foi analisado por IV. Por comparação dos espectros de IV do FBA com o do produto **2.22**, observou-se um desvio de 40-100 cm^{-1} para frequências mais altas. A 1733 cm^{-1} observa-se uma banda de intensidade forte, característica da vibração de alongamento do grupo carbonilo de ésteres α,β -insaturados. Para além disso, a 1770 cm^{-1} observa-se outra banda, de intensidade forte, correspondente à vibração de alongamento dos carbonilos do succinimidil (ν lactamas: 1760-1730 cm^{-1}).⁶³ A análise elementar do composto **2.22** permitiu também confirmar a estrutura do SFB.

Devido à necessidade de elevadas quantidades de ácido 4-fluorobenzoico activado para a progressão do trabalho, e tendo em conta a diminuição do rendimento da reacção em cerca de 30% quando se aumenta a escala, optou-se por uma abordagem diferente. Neste caso, o ácido **2.20** foi activado na forma de éster de tetrafluorfenol (**2.24**), usando DCC como reagente de acoplamento (**Esquema 2.5**).⁶⁴



Esquema 2.5. Síntese do tetrafluorofenil-4-fluorobenzoato (**2.24**).

O controlo, por TLC ,aos 15 minutos (min) de reacção permitiu confirmar a presença do intermediário *O*-(4-fluorobenzoil)isourea. Quando o tetrafluorfenol (**2.23**) foi

adicionado, formou-se imediatamente um precipitado branco correspondente à *N,N'*-dodiclohexilureia (DCU). O composto **2.24** foi purificado inicialmente por cromatografia gravitacional em coluna. No entanto, a análise por RMN de ^1H das fracções isoladas mostrou a presença da DCU. Deste modo, foi necessário repurificar o composto **2.24** por cristalização em diclorometano (DCM) e éter de petróleo. Após os dois procedimentos purificativos, o composto **2.24** foi obtido com excelente rendimento ($\eta = 88\%$).

A presença de um multiplete a 6.98 ppm no espectro de ^1H -RMN do composto **2.24** foi indicativa da existência do próton do anel do tetrafluorfenol. Esta multiplicidade deve-se ao facto do próton acoplar com os quatro flúores do anel aromático. Este próton, como sofre o efeito electronegativo do flúor, está desblindado, apresentando, por isso, um desvio químico para campos mais baixos. No espectro de ^{13}C -RMN, o carbono ligado a esse próton apresenta-se na forma de um tripleto a 103.38 ppm, porque acopla com os dois flúores adjacentes. Outra característica distinta no espectro de ^{13}C -RMN do composto **2.24** é a presença de dois multipletos, a 140.78 ppm e a 146.09 ppm, correspondentes aos quatro carbonos ligados a átomos de flúor no anel do tetrafluorofenil. Estes carbonos apresentam um desvio químico para campos mais baixos devido ao facto de estarem ligados ao flúor, o que lhes confere menor densidade electrónica.

A realização do RMN de ^{19}F permitiu confirmar a presença de três tipos diferentes de flúor na molécula.

Tal como ocorreu com o SFB, o espectro de massa por ESI do composto **2.24** foi inconclusivo. Por isso, o composto foi também analisado por espectroscopia de IV. O composto **2.24** apresenta no seu espectro de IV a banda característica da vibração de alongamento do carbonilo de ésteres a 1759 cm^{-1} . A banda larga característica da vibração de alongamento do grupo hidroxilo dos ácidos a $2500\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ está ausente, confirmando a transformação química do ácido **2.20** no éster **2.24**.

Por fim, a análise elementar do composto **2.24** permitiu confirmar a sua estrutura, dada a proximidade entre os valores teóricos e experimentais calculados para as percentagens de C e H.

Quer com a síntese do **SFB** como com a do composto **2.24** pretendia-se a activação do FBA (**2.20**), para posterior acoplamento à ϵ -amina do resíduo de lisina. Ambas as abordagens foram realizadas com tempos de reacção curtos. No entanto, o tempo de purificação foi discrepante, já que o composto **2.24** tem a desvantagem de necessitar de uma re-purificação por cristalização, o que é um processo moroso. Não obstante, a síntese do SFB tem a desvantagem de o rendimento depender da quantidade de reagente limitante que se usa.

No futuro, para ultrapassar a limitação principal na síntese do composto **2.24**, a DCC poderá ser substituída por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida como reagente de acoplamento, já que a ureia que se forma é solúvel em água, facilitando a sua eliminação por extracção.

2.4.2. Hidrólise do grupo protector da ϵ -amina

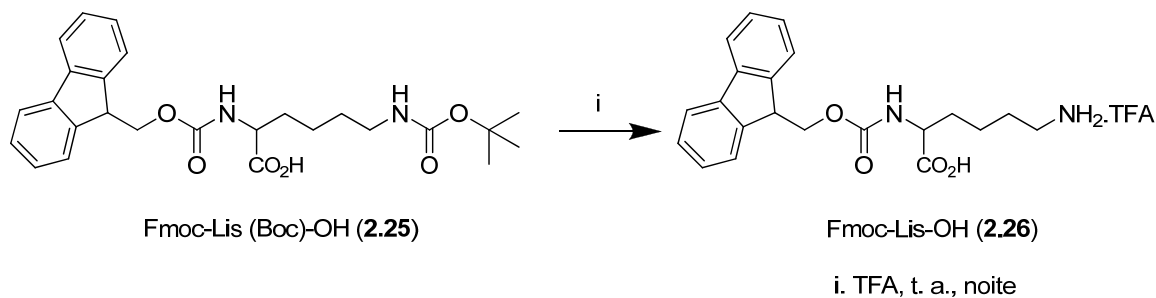
Normalmente, a síntese de péptidos fluorados é realizada através da reacção do ácido activado fluorado com o péptido. Neste caso, a reacção ocorre na ϵ -amina do resíduo da lisina.⁶² Esta estratégia é também a via preferencial para a conjugação de péptidos a moléculas de natureza não peptídica. A reacção de conjugação requer condições de pH bastante restritas, em que a selecção do tampão pode ser um processo de optimização moroso, que por vezes é difícil de realizar com sucesso.⁶⁵

Com base nas limitações descritas acima, explorou-se uma estratégia diferente para preparar o péptido fluorado. Nesta abordagem, a molécula de lisina é derivatizada com o grupo 4-fluorobenzoíl, previamente à sua inclusão na sequência peptídica.

De forma a podermos derivatizar a lisina, foi necessário hidrolisar o grupo *N*- ϵ -*t*-butil, uma vez que normalmente a lisina é comercializada na forma de *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -*t*-Boc-L-lisina. A desprotecção do grupo protector Boc foi efectuada de acordo com a reacção apresentada no **Esquema 2.6**. O grupo Boc é normalmente removido com 25-50% de TFA em DCM.⁶⁶ No entanto, quando a reacção foi realizada sob essas condições, a remoção não foi completa. Deste modo, foi necessário usar uma concentração de TFA a 100% para que a reacção fosse bem sucedida. Quando completa, esta reacção apresenta

também a vantagem de não requerer qualquer purificação, obtendo-se o produto hidrolisado com rendimento quantitativo.

A reacção foi controlada por TLC e por RMN de ^1H . Quando o grupo Boc é completamente hidrolisado o singuleto a 1.34 ppm, no espectro de ^1H -RMN do composto **2.26**, está ausente.



Esquema 2.6. Hidrólise do grupo *N*-ε-*t*-Boc.

Após o fim da reacção, o composto **2.26** foi completamente caracterizado pelas técnicas 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (espectroscopia de correlação homonuclear com gradiente (gCOSY), espectroscopia de coerência heteronuclear quântica única, do inglês *Heteronuclear single quantum coherence*, (HSQC)) de RMN. Desta forma, realizou-se uma caracterização extensiva dos prótons e dos carbonos, de forma a proporcionar uma melhor atribuição da lisina quando derivatizada com o grupo 4-fluorobenzoíl. A atribuição dos picos aos prótons alifáticos H^ϵ , H^δ , H^γ e H^β foi feita através de um espectro de gCOSY (**Figura 2.5**).

Iniciou-se a atribuição pelo tripleto a 2.82 ppm que corresponde aos prótons ϵ que estão ligados ao grupo amina terminal e, por isso, apresentam uma ressonância a campo mais baixo que os restantes prótons da cadeia alquílica. Os prótons ϵ acoplam apenas com os prótons δ e, por isso, apresentam uma multiplicidade de tripleto. Da correlação entre os prótons ϵ com os prótons δ inferiu-se que estes têm um desvio químico a 1.60 ppm. Por sua vez, esses prótons acoplam com o multipletto a 1.48 ppm (prótons γ). Por fim, atribui-se o multipletto a 1.83 ppm aos prótons β que, como se vê por gCOSY, acoplam com os prótons γ , o que confirma essa atribuição.

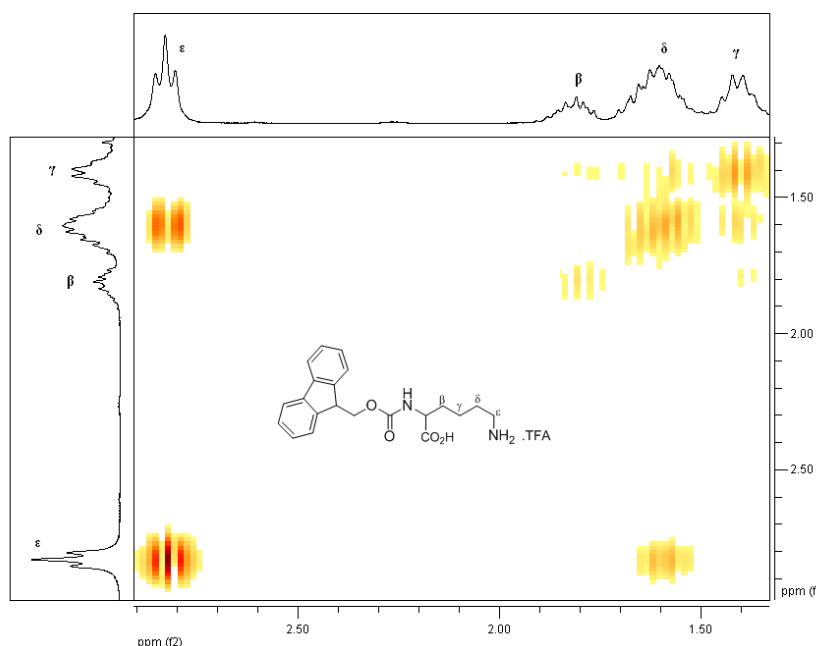


Figura 2.5. Ampliação do espectro de gCOSY dos prótons alifáticos H^ε, H^δ, H^γ e H^β do composto **2.26**.

Quer o H-α, quer o H-9 apresentam uma multiplicidade de tripleto. No entanto, a partir da correlação dos prótons β com o tripleto a 4.15 ppm, foi possível atribuir este pico ao H-α. Desta forma, o desvio químico a 4.24 ppm é atribuído ao H-9, que por sua vez está correlacionado com o duplete que aparece a 4.31 ppm, atribuído ao H-14.

No espectro de ¹H-RMN o padrão de multiplicidade esperado para o anel fluoreno seria a presença de dois dupletos (H-1/H-8 e H-4/H-5) e de dois tripletos (H-2/H-7 e H-3/H-6). Contudo, e tal como se pode ver na **Figura 2.6**, os prótons H-1 e H-8 apresentam-se na forma de duplete com ressonâncias magnéticas a campos diferentes, nomeadamente a 7.57 e 7.59 ppm. Desta forma, o único duplete com integração a dois prótons corresponde aos prótons H-4 e H-5. Estes prótons apenas acoplam com o tripleto a 7.31 ppm e, por isso, esse sinal corresponde aos prótons vicinais H-3 e H-6. Para além disso, os prótons H-3 e H-6 também apresentam uma correlação com o tripleto a 7.22 ppm, atribuído, por isso, aos prótons H-2 e H-7. Esta atribuição está em conformidade com a correlação observada entre o tripleto a 7.22 ppm com os dois dupletos a 7.57 e 7.59 ppm, atribuídos aos H-1 e H-8.

No espectro de ¹³C-RMN a ausência dos sinais a 82.93 e 27.92 ppm, correspondentes aos carbonos quaternário e metilos do grupo Boc, respectivamente, confirma também a

completa transformação do composto **2.25** em composto **2.26**. A identificação dos carbonos do Fmoc-Lys-OH (**7**) foi realizada com o auxílio do HSQC e vem descrita na secção 5.4.3.

A análise do espectro de IV do composto **2.26** evidencia a presença de uma banda larga e pouco forte a 3061 cm^{-1} , característica da vibração de alongamento de aminas primárias⁶³, indicando desta forma também a desprotecção da ϵ -amina.

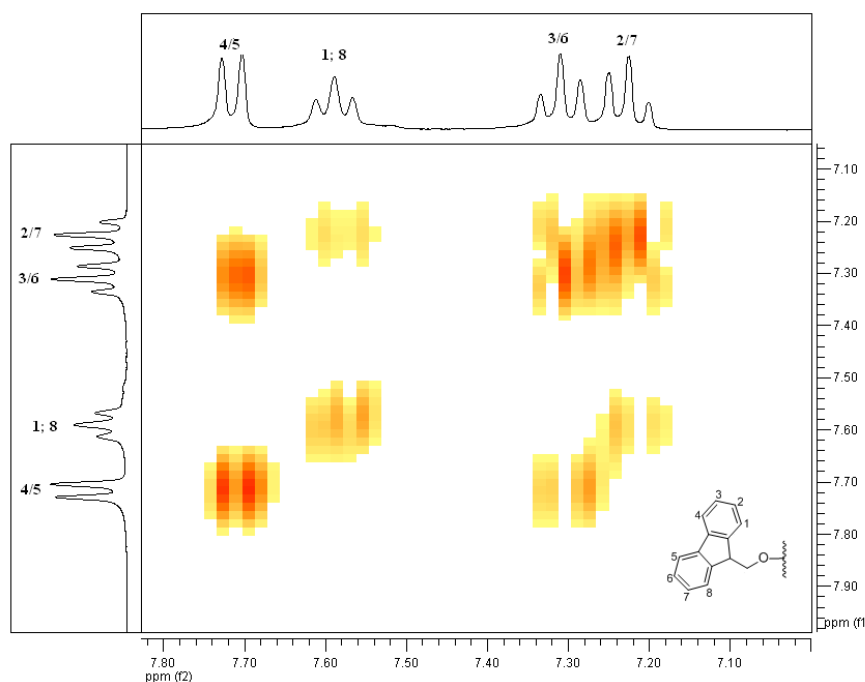


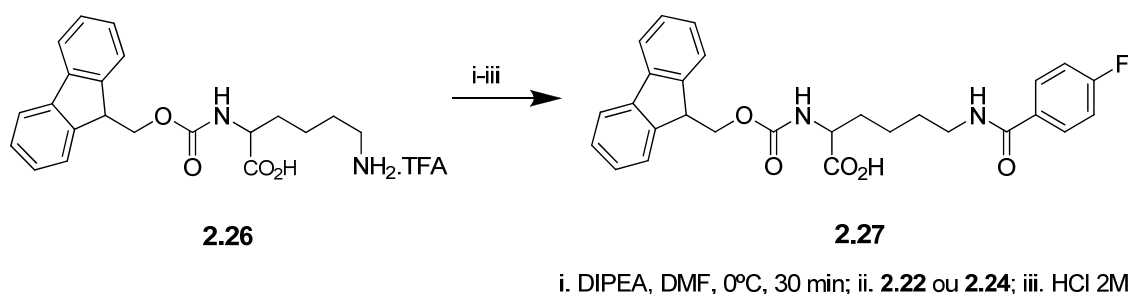
Figura 2.6. Ampliação do espectro gCorry dos prótons aromáticos do composto **2.26**.

2.4.3. Amidação da ϵ -amina do Fmoc-Lys-OH

O composto Fmoc-Lys(4-fluorobenzoil)-OH (**2.27**) foi sintetizado através da conjugação do 4-fluorobenzoil à Fmoc-Lys-OH em condições básicas (**Esquema 2.7**).⁶⁷

Foi usada uma base (*N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA)) de forma a neutralizar a ϵ -amina do Fmoc-Lys-OH, que se encontra na forma de contra-íão com o TFA. Numa primeira abordagem, usamos o SFB (**2.21**). No entanto, esta forma activada do ácido proporciona rendimentos moderados ($\eta = 47\%$). Devido à susceptibilidade do composto **2.22** à hidrólise, a reacção pode não ser completa.

De forma a obter o composto **2.27** com melhor rendimento, decidiu-se experimentar a reacção de amidação com o ácido activado na forma de ester tetrafluorofenil (**2.24**), mantendo a mesmas condições experimentais. Com esta abordagem, o composto **2.27** foi efectivamente obtido com maior rendimento ($\eta = 72\%$).



Esquema 2.7. Síntese do Fmoc-Lys (4-fluorobenzoíl)-OH (**2.27**).

Normalmente, o grupo protector Fmoc é hidrolisado selectivamente com uma solução de piperidina a 20% em DMF. No entanto, foi descrito que em algumas condições experimentais este grupo pode também ser hidrolisado com uma solução de DIPEA em DMF a várias concentrações.⁶⁸ Assim, antes de se proceder à purificação do composto **2.27**, foi necessário ajustar o pH a 7 com a adição de uma solução de HCl 2 M. Com a adição do ácido e ajustamento do pH essa reacção secundária está minimizada quando o solvente é concentrado.

O composto **2.27** foi caracterizado por ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ¹⁹F-RMN, ESI-MS e IV. No espectro de RMN de ¹H o tripleto a 2.82 ppm, atribuído ao grupo metileno ϵ do composto **2.26**, sofre um desvio para campos mais baixos ($\delta = 3.42$ ppm) no composto **2.27**, confirmando desta forma a transformação do grupo amina num grupo amida. A campo alto surgem três multipletos a 1.54 ppm, 1.69 ppm, e a 1.93 ppm correspondentes aos protões alifáticos γ , δ e β , respectivamente. O protão α , que mostra uma correlação com o protão β (**Figura 2.7**), apresenta um desvio químico de 4.17 ppm. Tal como em **2.26**, surge um tripleto a 4.24 ppm e um duplete a 4.37 ppm, que correspondem aos protões H-9 e H-14, respectivamente (**Figura 2.7**).

A campo mais baixo, para além dos picos observados do grupo fluoreno, observam-se também os picos atribuídos aos protões aromáticos do grupo 4-fluorobenzoíl, a 7.17

ppm e 7.89 ppm. Tal como nos compostos **2.22** e **2.24**, estes picos apresentam uma multiplicidade de duplo duplete devido ao acoplamento de protão-protão e protão-fluór.

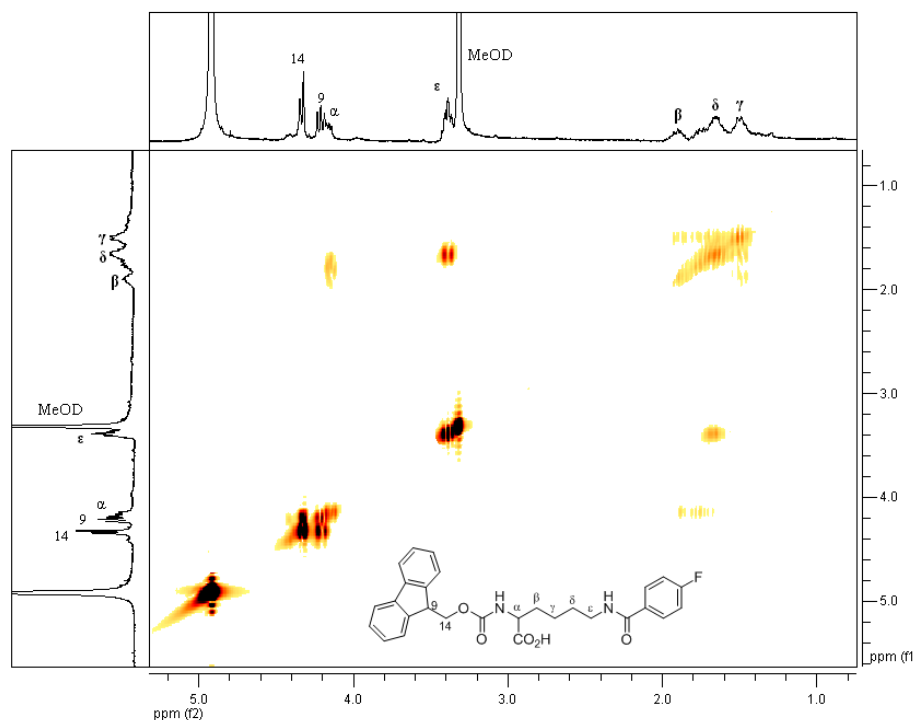


Figura 2.7. Ampliação do espectro de gCOSAY dos protões alifáticos do composto **2.27**.

O espectro de ^{13}C -RMN apresenta, a campo alto, vários singuletos correspondentes aos carbonos da cadeia alifática com desvios químicos muito semelhantes aos observados na Fmoc-Lys-OH (**2.25**). A 40.77 ppm surge um pico, que como se pode ver pelo HSQC (**Figura 2.8**), corresponde ao desvio químico do C- ϵ . Este carbono não sofre desvio químico relativamente ao composto **2.26**. Tal como se pode ver na **Figura 2.8**, o C-14 apresenta um desvio químico a campo mais baixo ($\delta = 67.95$ ppm) do que o C-9 ($\delta = 42.23$ ppm). A diferença entre estes dois carbonos deve-se ao facto de o C-14 estar mais desblindado por estar directamente ligado a um oxigénio que, como é um atractor de electrões, retira-lhe densidade electrónica.

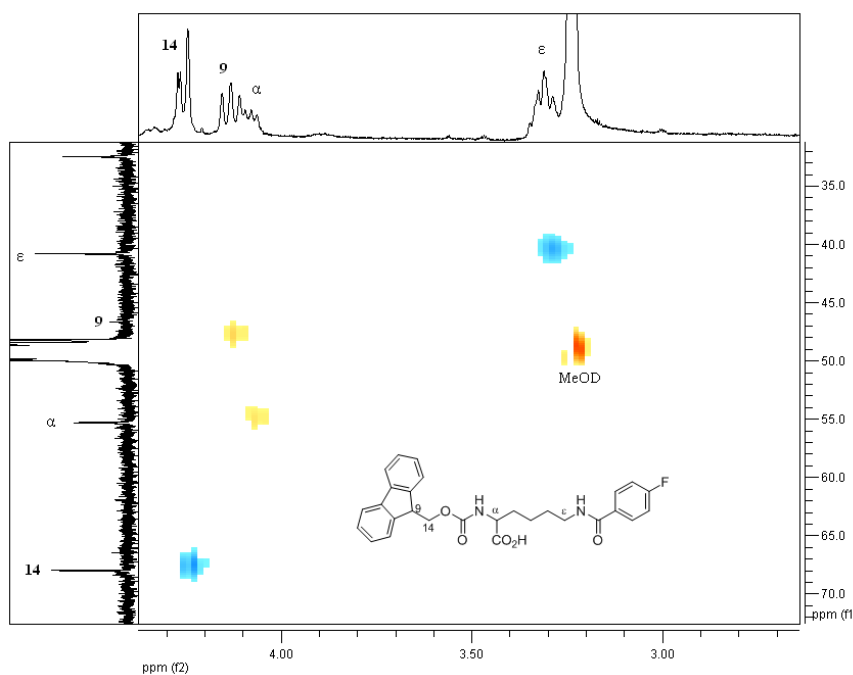


Figura 2.8. Ampliação do espectro de HSQC da região alifática do composto **2.27**

A análise por HSQC do composto **2.27** permitiu também identificar os carbonos aromáticos do grupo fluoreno e 4-fluorobenzoíl (**Figura 2.9**).

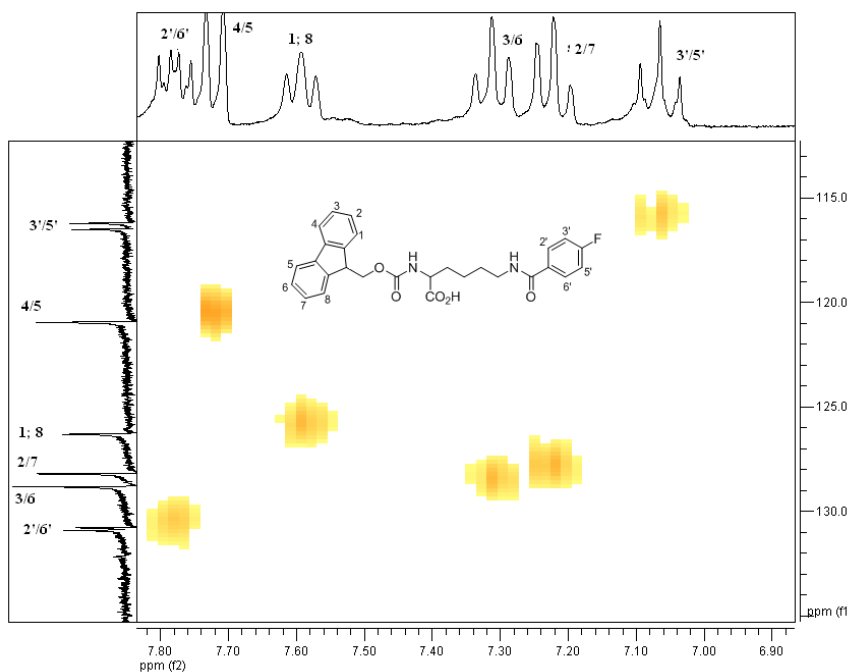


Figura 2.9. Ampliação do espectro de HSQC da região aromática do composto **2.27**.

A 116.33 ppm surge um duplete ($^2J_{C-F} = 22.1$ Hz) que corresponde aos carbonos aromáticos do grupo 4-fluorobenzoíl, que acoplam com o átomo de flúor em *orto*. Os picos dos carbonos aromáticos deste grupo, que acoplam com o flúor em meta (*orto* em relação ao carbonilo), apresentam-se desviados para campo mais baixo ($\delta = 130.82$ ppm) e com uma constante de acoplamento menor ($^3J_{C-F} = 9.1$ Hz).

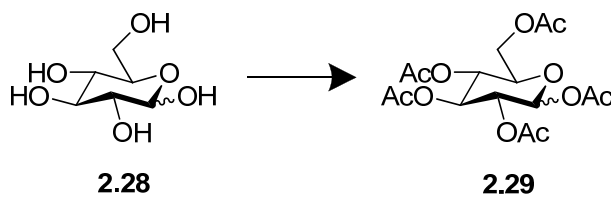
No espectro de RMN de ^{19}F do composto **2.27** observa-se um sinal a -107.44 ppm, atribuído ao átomo de flúor da molécula, confirmando a conjugação do ácido activado à Fmoc-Lys-OH (**2.26**).

O espectro de massa do composto **2.27** confirma a sua estrutura. Tal como no espectro de IV do composto **2.26**, no espectro do composto **2.27** observam-se bandas fortes entre 1670-1710 cm^{-1} , características da vibração de alongamento do grupo carbonilo do ácido carboxílico e do carbamato. No espectro de IV do composto **2.27** observa-se também uma banda forte a 1618 cm^{-1} , características da vibração de alongamento do grupo carbonilo de amidas⁶³. Devido à transformação de um grupo éster num grupo amida, este carbonilo sofre vibração a frequências mais baixas.

2.4.4. O-Protecção da D-glucose

Tal como descrito na Secção 2.1, um dos objectivos deste trabalho é a síntese de um análogo do péptido **ASI-1** glicosilado. Desta forma, decidiu-se preparar um derivado da D-glucose com um grupo carboxílico na região aglicona de forma a possibilitar a conjugação ao péptido. Iniciou-se a síntese do derivado da D-glucose com a protecção dos grupos hidroxilos na forma de grupos *O*-acetato. Esta protecção é necessária de forma a minimizar a interferência destes grupos nas condições de síntese do S-glicosídeo, bem como por necessidade de ter um grupo *O*-acetato na posição 1 e 2 do anel piranosido.

Os cinco grupos hidroxilos da D-glucose foram acetilados (**Esquema 2.8**) com catálise básica⁶⁹ ou ácida⁷⁰ (**Tabela 2.2**).



Esquema 2.8. Síntese da D-glucose-pentaacetato (2.29).

Tabela 2.2. Condições de acetilação dos grupos hidroxilo.

Catálise	Condições	Rendimento 2.29 (%)	Razão α/β
Básica	Piridina, anidrido acético, 24 h	85	81:19
Ácida	Ácido acético, anidrido acético, ácido sulfúrico, 1h	98	51:49

Quando a reacção de catálise foi realizada em condições básicas, após o tratamento da mistura reaccional obtida, a análise por ^1H -RMN mostrou predominância do anómero α , enquanto que sob condições ácidas se obteve uma mistura anomérica α/β de 51:49 (Tabela 2.2).

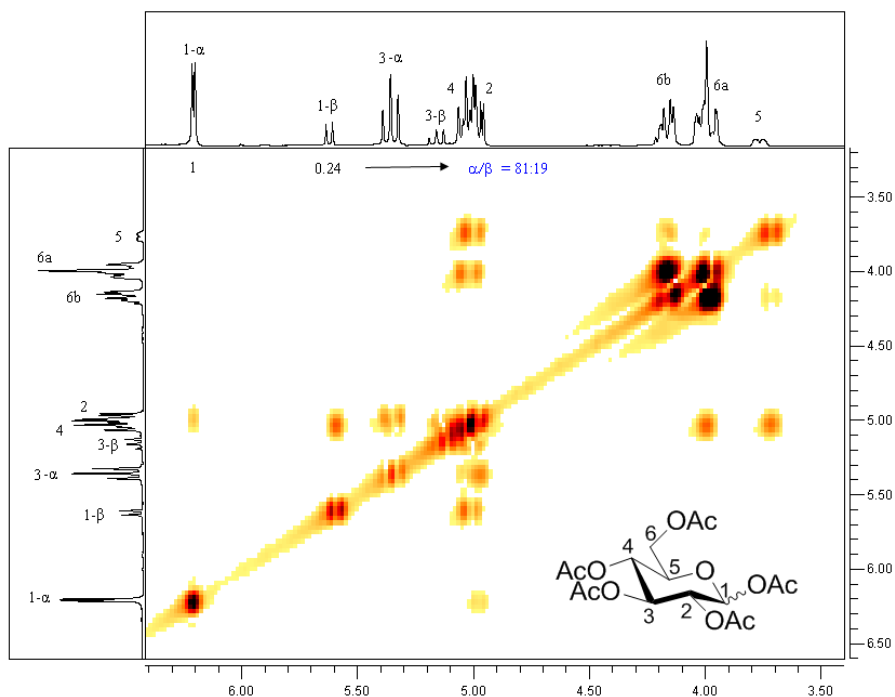


Figura 2.10. Espectro de gCOSY do composto 2.29. A razão anomérica α/β (81:19) está evidenciada a azul.

No espectro de ^1H -RMN do composto **2.29** o pico correspondente ao H-1 aparece na forma de duplete a desvios químicos diferentes no anómero α ($\delta = 6.33$ ppm) e β ($\delta = 5.69$ ppm), permitindo dessa forma determinar a razão anomérica. A constante de acoplamento entre o H-1 e o H-2 é distinta entre os dois anómeros. No anómero α é da ordem dos 3.8 Hz ($J_{\text{Hax-Heq}}$), enquanto que no anómero β é cerca de 8.6 Hz ($J_{\text{Hax-Hax}}$). Quer no pentaacetato de α -D-glucose quer no pentaacetato de β -D-glucose, os restantes prótons (H-2 a H-6) apresentam desvios químicos idênticos. Para além disso, no espectro de ^1H -RMN são observados cinco singuletos ($\delta = 2.02, 2.03, 2.04, 2.05$ e 2.19 ppm), integrados a quinze prótons, confirmando dessa forma a presença de cinco grupos acetatos em **2.29**. Como o H-4 e H-2 têm desvios químicos muito próximos e multiplicidades idênticas, a correlação do tripleto a 5.07 ppm com o duplete a 5.69 ppm e a 6.33 ppm (**Figura 2.10**) permite atribuir este pico ao H-2. No gCoty do composto **2.29**, observa-se ainda que o sinal a 5.11 ppm (H-4) se encontra acoplado com o H-5 a 3.90 ppm.

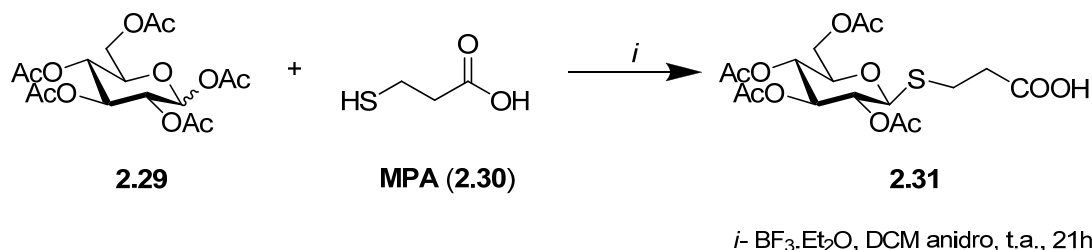
No espectro de ^{13}C -RMN do composto **2.29** verifica-se também uma diferença nos desvios químicos dos C-1 α ($\delta = 88.73$ ppm) e C-1 β ($\delta = 91.55$ ppm). Os carbonos foram identificados com o auxílio da experiência bidimensional HSQC.

2.4.5. Síntese do (2'-carboxietil)-2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-D-glucopiranosido (2.31)

Foi, então, concebida a síntese do tio-glucosídeo **2.31** que apresenta uma maior estabilidade *in vivo* em relação à degradação por via das glicosidases. Entre os métodos descritos na literatura⁷¹⁻⁷³, decidiu proceder-se à síntese do composto **2.31** mediada pelo ácido de Lewis boro trifluoreto dietil eterado ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) (**Esquema 2.9**).

Esta reacção foi realizada usando diferentes razões anómericas do pentaaceto de α/β -glucose (**2.29**). A análise por ^1H -RMN dos crudes das reacções revelou que quando se partiu de pentaacetato de glucose com uma razão $\alpha:\beta$ de 81:19, a conversão de **2.29** no composto **2.31** foi de apenas 32%. Esta conversão foi aumentada para 66 % quando essa razão foi de 51:49. Apesar de melhorada, esta conversão não foi significativa.

Constatou-se, então, que com o aumento do anómero β a conversão de **2.29** em **2.31** aumentou.

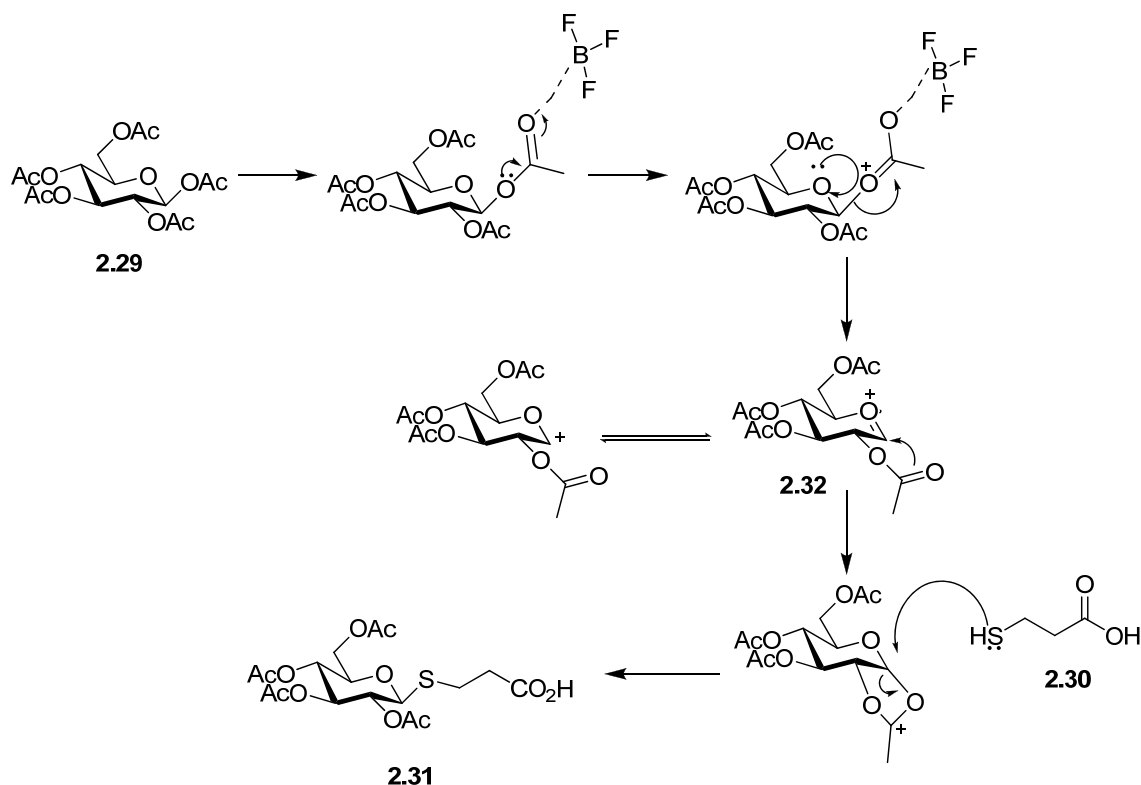


Esquema 2.9. Síntese do (2' carboxietil)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-tio-D-glucopiranosido (**2.30**).

Desta forma, decidiu-se usar o anómero β puro do pentaacetato da D-glucose (**2.29 β**) para a síntese do (2'-carboxietil)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-tio-D-glucopiranosido (**2.31**). Tal como nos casos anteriores, a reacção foi controlada por ¹H-RMN e conclui-se que ao fim de 21 horas, a conversão foi completa.

De seguida, o composto **2.31** foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Como quer o ácido mercaptopropiónico (MPA) (**2.30**), que está em excesso estequiométrico, quer o composto desejado (**2.31**) não têm cromóforos que permitam a sua visualização na lâmpada de UV, as TLC's das fracções recolhidas foram reveladas com uma solução de H₂SO₄/EtOH, seguida de aquecimento da placa de TLC. Este revelador é sensível à maioria dos grupos funcionais, sobretudo os grupos nucleofílicos.⁶⁹ O controlo por TLC dessas fracções foi repetido e foram reveladas numa câmara de iodo de forma a detectar a presença ou ausência do MPA.

Nestas condições, em que a reacção foi catalisada por um ácido de Lewis, o tioglucosídeo **2.31** foi obtido exclusivamente na conformação β . O ácido de Lewis é usado para activar o grupo carbonilo do 1-*O*-acetilo e dessa forma deslocaliza a carga do oxigénio do anel, tornando o grupo acetilo um melhor grupo abandonante. Este mecanismo ocorre com a participação do grupo vizinho, o grupo *O*-acetilo mais próximo. Quando se forma o acetal há muito impedimento estereoquímico na face inferior e, por isso, o MPA ataca preferencialmente pela face superior, formando-se exclusivamente o composto β (**Esquema 2.10**).



Esquema 2.10. Mecanismo proposto para a formação do composto **2.31**.

O composto **2.31** foi caracterizado por ^1H -RMN. Por comparação com o espectro de ^1H -RMN do MPA conclui-se que os prótons alifáticos da parte aglicona têm um desvio químico semelhante, dado que o seu ambiente químico não sofreu alterações significativas. O tripleto a 1.67 ppm, observado no espectro de ^1H -RMN do MPA, e atribuído ao próton do mercapto, está ausente no espectro do composto **2.31**. A campo mais alto ($\delta = 1.95\text{-}2.03$ ppm) o espectro de ^1H -RMN apresenta apenas quatro singletos, atribuídos a quatro metilos dos grupos acetato, e confirmando a substituição de um grupo acetato pelo mercapto **2.30**. A identificação dos prótons do anel de *O*-glucopiranosido foi feita através de um espectro de gCoty (**Figura 2.11**).

No anel glucopiranosido os prótons H-6 são diastereotópicos e, por isso, acoplam entre si e com o H-5. No espectro de ^1H -RMN do composto **2.31**, os prótons H-6 têm um desvio químico a 4.08 ppm e a 4.18 ppm com uma multiplicidade de duplo duplete. Esses prótons acoplam com o multiplete a 3.64 ppm, atribuído ao H-5. Este multiplete, para além da correlação com os prótons H-6, acopla também com o duplo duplete a 5.01 ppm (H-4). O H-4 acopla também com o H-3 (duplo duplete a 5.16 ppm). Por fim, o duplo duplete a 4.97 ppm é atribuído ao H-2, que apresenta uma correlação com o H-3 e

com o duplete a 4.48 ppm (H-1) (**Figura 2.11**). Com a formação da ligação *S*-glicosídica, o H-1 sofre um desvio para campos mais altos. Como em **2.31**, o C-1 está ligado ao átomo de enxofre, que é menos electroatractor que o oxigénio, ficando o H-1 mais blindado.

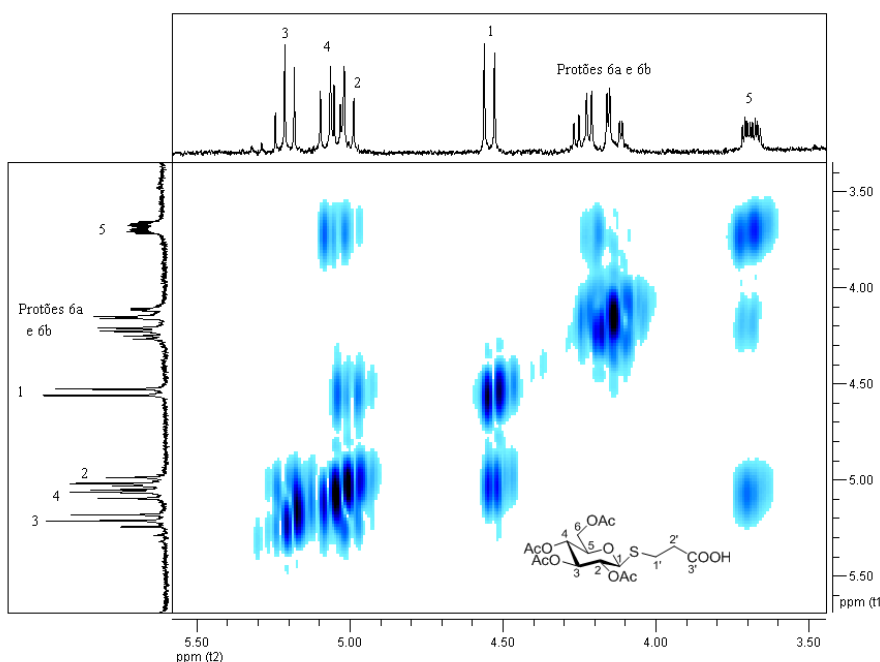


Figura 2.11. Ampliação do espectro de gCoty dos protões do anel piranosido do composto **2.31**.

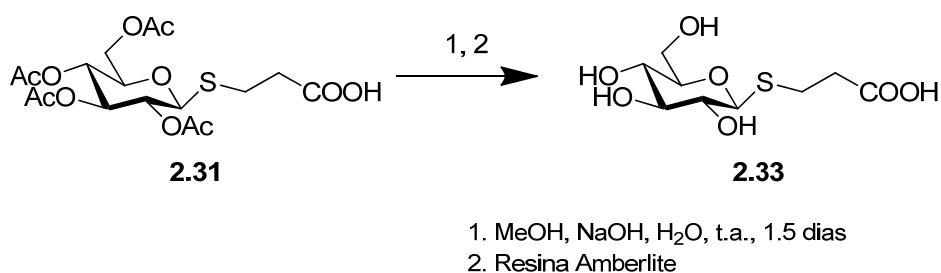
O composto **2.31** também foi caracterizado por ^{13}C -RMN e a atribuição dos carbonos foi feita com o auxílio do espectro de HSQC. Para além do espectro de RMN de ^1H , o espectro de RMN de ^{13}C permite também avaliar o grau de pureza de **2.30** (pela ausência do pico correspondente ao carbono carboxílico do MPA, com desvio químico a 177.89 ppm e distinto do carbono carboxílico do composto **2.31** ($\delta = 176.62$ ppm)).

Por fim, a caracterização do composto por ESI-MS permitiu confirmar a estrutura do composto **2.31** (m/z 435 $[\text{M-H}]^-$ (56%)).

2.4.6. Hidrólise dos grupos acetato

Uma vez no organismo humano, os grupos acetatos do composto **2.31** deverão sofrer hidrólise por parte das estérases. De forma a poderem realizar-se os estudos pré-clínicos com o péptido na forma como se encontra no cérebro, sintetizou-se o péptido com os grupos hidroxilos na forma desprotegida. Assim, decidiu-se hidrolisar os grupos acetato antes de se conjugar o tioglucosido ao análogo do **ASI-1**.

A desprotecção dos grupos *O*-acetato realizou-se em condições básicas com hidróxido de sódio em metanol e água, seguida da neutralização com uma resina acídica (**Esquema 2.11**).



Esquema 2.11. Representação esquemática da hidrólise dos grupos *O*-acetato.

O composto **2.33** foi caracterizado por ¹H-RMN e ¹³C-RMN. A identificação dos prótons e dos carbonos foi feita com o auxílio de espectros de gCOSY (**Figura 2.12**) e HSQC (**Figura 2.13**)

O duplete a 4.44 ppm, atribuído ao H-1, acopla com o duplo duplete a 3.22 ppm, que corresponde ao sinal do H-2. De seguida, atribuíram-se os duplos dupletos a 3.71 ppm e a 3.89 ppm aos prótons H-6a e H-6b. Tanto o H-2 como os prótons H-6a e H-6b apresentam uma correlação com um sinal no intervalo de 3.34 a 3.41 ppm (coincidente com o sinal do solvente MeOD). Desta forma, pode-se inferir que o H-3, o H-5 e, provavelmente, também o H-4 se encontram nesse intervalo (**Figura 2.12**).

O espectro de HSQC do composto **2.33** permitiu confirmar a existência de três prótons de 3.34 a 3.41 ppm, uma vez que nesse intervalo existem correlações com três carbonos diferentes (**Figura 2.13**). A campo mais baixo do espectro de ¹³C-RMN está o único

carbono carbonílico da molécula que está mais desblindado que os restantes por estar em ressonância com o oxigénio.

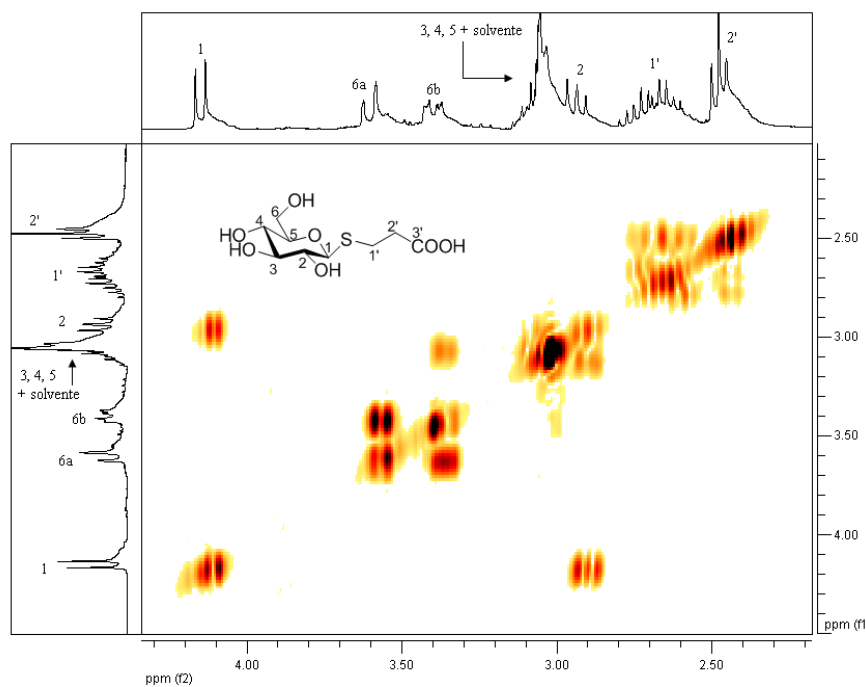


Figura 2.12. Espectro de gCoty do composto 2.33.

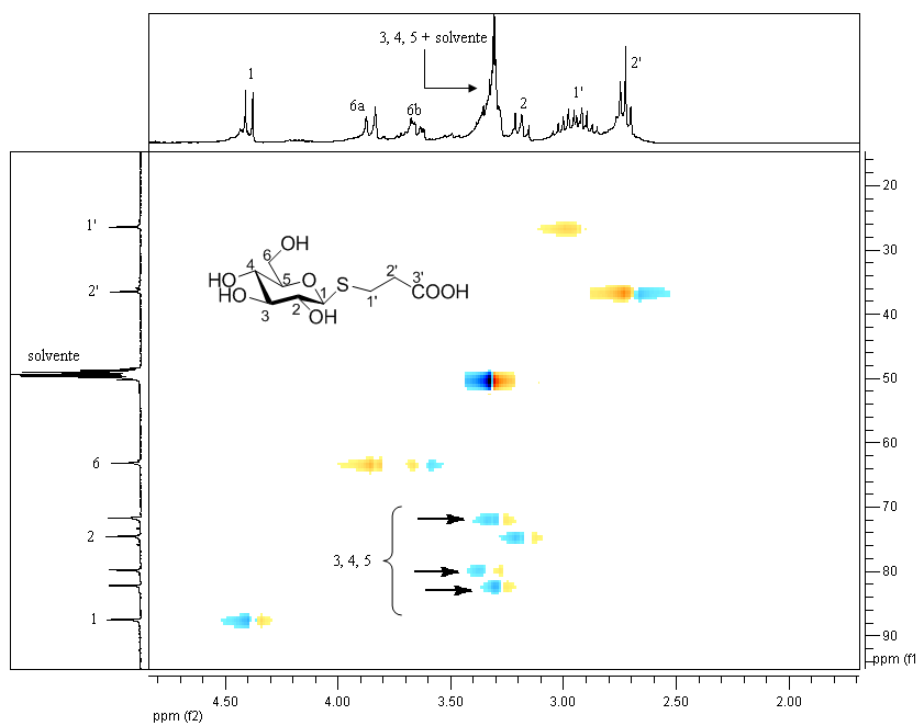


Figura 2.13. Espectro de HSQC do composto 2.33.

2.4.7. Síntese de péptidos

O pressuposto deste trabalho é a concepção de péptidos que interactuem com a proteína α -sin. Após identificação da sequência peptídica responsável pela agregação na α -sin foram concebidos pequenos péptidos homólogos dessa região de forma a promover a interacção com a proteína e inibir a sua agregação. Os péptidos correspondentes à região hidrofóbica localizada na parte central da α -sin (resíduos 64-86) são os que têm maior afinidade de ligação para a α -sin. Entre esses, o péptido **ASI-1** (RGGAVVTGR-NH₂) inibe completamente a formação de fibras amilóides. Por outro lado, o péptido **ASI-4** (RGVVGR-NH₂) não inibe a agregação da α -sin.^{2,74}

As sequências peptídicas sintetizadas no trabalho descrito nesta tese foram então as seguintes:

- R-G-G-A-V-V-T-G-R-NH₂: **ASI-1**
- R-G-A-V-V-G-R-NH₂: **ASI-4**
- R-G-G-A-V-V-T-G-R-K- β A-NH₂: **ASI-1a**
- R-G-G-V-V-T-G-R-K(fluorobenzoíl)- β A-NH₂: **ASI-1b**
- R-G-G-A-V-V-T-G-R-K(4-fluorobenzoíl)- β A-(2'-carboxietil)tioglicosido: **ASI-1c**
- R-G-A-V-V-T-G-R-K(4-fluorobenzoíl)- β A-FITC: **ASI-1d**
- R-G-A-V-V-T-G-R-K- β A-FITC: **ASI-1e**

Neste trabalho foram sintetizados os péptidos **ASI-1**, **ASI-4**, e **ASI-1 (a-e)**. As sequências peptídicas aqui descritas foram preparadas num sintetizador automático, usando a química do Fmoc e a técnica SPPS já descrita (Secção 2.3.1). Os análogos do **ASI-1 (b-e)** foram também sintetizados manualmente, ainda em fase sólida.

Com base na literatura, e tendo em conta que o **ASI-1** é o péptido com melhor perfil biológico,^{2,74} este péptido foi sintetizado para servir como controlo positivo para a avaliação futura dos seus análogos. Para controlo negativo na avaliação biológica, foi sintetizado o péptido **ASI-4**, por se saber não inibir a agregação de α -sin.

De forma a preparar análogos do **ASI-1 (Figura 1.6)** foi adicionado à sequência original deste péptido um resíduo de lisina seguido de um de β -alanina (**ASI-1a**) (**Figura 2.14, Esquema 2.12**). Este esqueleto dipeptídico irá possibilitar a conjugação de uma

molécula radiofluorada e/ou tioglicosido ou uma sonda fluorescente. A preparação do **ASI-1a** irá também possibilitar a sua avaliação pré-clínica e determinar a influência da adição destes dois resíduos na inibição da agregação da α -sin comparada com a observada para o **ASI-1**. A conjugação da molécula radiofluorada (^{18}F -SFB) ocorre na ϵ -amina da lisina. Desta forma, o péptido **ASI-1a** foi integralmente preparado no sintetizador ainda protegido com o grupo Fmoc na amina terminal (**ASI-1a-NHFmoc**), que será usado posteriormente para a radiofluoração. Parte deste **ASI-1a-NHFmoc** foi tratado com uma solução de piperidina a 20% em DMF para desprotecção do Fmoc. O péptido **ASI-1a** foi, assim, obtido para os estudos biológicos.

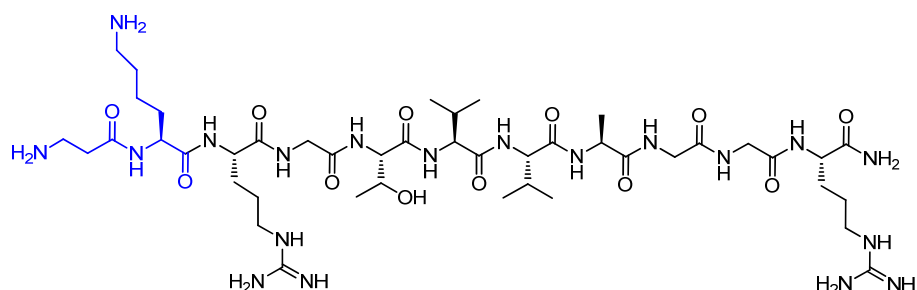
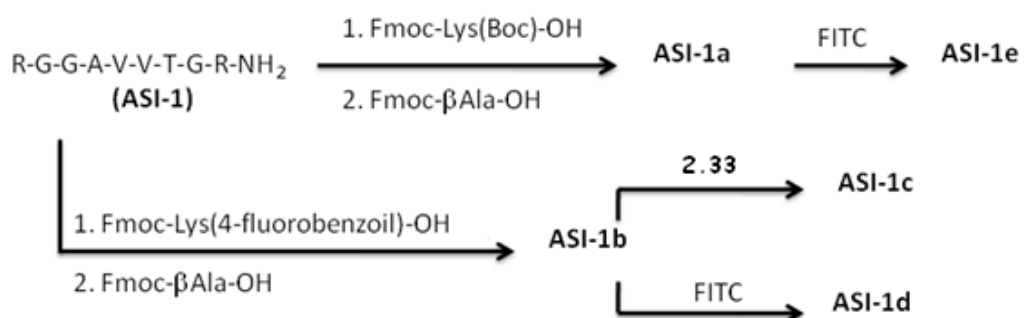


Figura 2.14. Péptido **ASI-1a**. A sequência do péptido ASI-1 está evidenciada a preto. Os resíduos de Lys e β Ala adicionais estão marcados a azul.



Esquema 2.12. Representação da síntese dos análogos **ASI-1**.

Foram também sintetizados outros análogos do **ASI-1**, nos quais a sequência RGGAVVTGR foi acoplado o resíduo de lisina derivatizada na posição ϵ -amina com o grupo 4-fluorobenzoíl (composto **2.27**) seguida do resíduo de β -alanina. Por fim, este péptido (**ASI-1b**) foi conjugado ao (2'-carboxi)etil-tioglicosido (**2.33**) e ao FITC para obter os péptidos **ASI-1c** e **ASI-1d**, respectivamente (**Esquema 2.12**). A FITC foi acoplada selectivamente à amina terminal da sequência peptídica através de uma ligação tioureia.

A síntese dos péptidos **ASI-1b**, **ASI-1c**, e **ASI-1d** fluorados foi concebida para posterior caracterização dos péptidos radiofluorados. A caracterização dos compostos radioactivos é realizada por comparação da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) analítica com o composto parente frio. A avaliação biológica será realizada *in vitro* usando os péptidos **ASI-1b**, **ASI-1c**, e **ASI-1d**.

Tal como no caso do **ASI-1a**, o estudo da interacção do **ASI-1b** com a α -sin irá determinar a influência que a conjugação do grupo 4-fluorobenzoíl aos péptidos tem na inibição da agregação da α -sin.

Com o péptido **ASI-1c** serão realizados estudos *in vitro* num modelo que mimetiza a BHE para determinação da capacidade do glicopéptido em atravessar a barreira. Desta forma, pretende-se avaliar se a glicosilação dos péptidos é uma estratégia que permite, ou não, a distribuição desta família de péptidos no cérebro.

O péptido **ASI-1d**, que contém uma sonda fluorescente (FITC), foi sintetizado de forma a possibilitar a realização de estudos *in vitro* de ligação a monómeros e agregados de α -sin por métodos fluorimétricos.

Por fim, foi também sintetizado o **ASI-1e** por conjugação da FITC ao **ASI-1a** (**Esquema 2.12**). Este péptido fluorescente será posteriormente radiofluorado, e desta forma preparar-se-á uma possível sonda dual (^{18}F -**ASI-1e**) para imagiologia de PET e óptica.

Os péptidos **ASI-1b**, **ASI-1c**, **ASI-1d** e **ASI-1e** foram sintetizados manualmente em fase sólida, usando um equipamento de teflon e uma corrente de azoto. A síntese dos péptidos **ASI-1b**, **ASI-1c** e **ASI-1d** realizou-se a partir da sequência Arg(Pbf)-Gly-Gly-Ala-Val-Val-Thr(*t*Bu)-Gly-Arg(Pbf)-NH₂ ligada à resina, enquanto que a síntese do

ASI-1e ocorreu a partir da sequência Arg(Pbf)-Gly-Gly-Ala-Val-Val-Thr(*t*Bu)-Gly-Arg(Pbf)-Lys(Boc)- β Ala-NH₂ ligada à resina (**Esquema 2.12**). Os acoplamentos, quer dos aminoácidos seleccionados, quer das moléculas não peptídicas, foram repetidos e controlados pelo teste de Kaiser. A seguir a cada acoplamento bem sucedido o grupo Fmoc foi hidrolisado, seguido de um novo acoplamento. Na maior parte dos casos, observou-se que foi necessário repetir três vezes o procedimento de acoplamento do Fmoc- β Ala-OH à sequência peptídica em fase sólida. Como os péptidos descritos nesta tese têm onze aminoácidos, a necessidade de repetir os últimos acoplamentos pode ser devida à menor reactividade da matriz polimérica, uma vez que os acoplamentos eficientes ocorrem numa matriz polimérica peptídica completamente solvatada, onde a penetração dos reagentes é rápida e desimpedida. No entanto, quando a sequência peptídica tem um determinado número de aminoácidos, normalmente entre 6 a 12 resíduos, a matriz de reacção pode tornar-se parcialmente inacessível, dificultando dessa forma os acoplamentos. Apesar de não ser muito consensual, pensa-se que a matriz se torna inacessível devido à formação temporária de ligações de hidrogénio intramoleculares.^{55,56,58}

Após terminada a síntese dos péptidos no sintetizador automático e/ou manualmente, a resina e os grupos protectores das cadeias laterais foram hidrolisados com uma solução de TFA/Tis/H₂O (95:2.5:2.5, v:v:v). Os péptidos foram, em seguida, purificados por HPLC preparativa.

Normalmente, a hidrólise da resina e dos grupos protectores ocorreu durante 4 horas à temperatura ambiente com sucesso. No entanto, no caso do péptido **ASI-1a**, observou-se hidrólise apenas parcial de um dos grupos pentametildihidrobenzofurano sulfonil (pbf) da arginina. Como neste péptido o resíduo de lisina não derivatizado está adjacente a um dos resíduos de arginina, hipotetizou-se que a ϵ -amina livre interfere com a hidrólise deste grupo protector do grupo guanidina.

Todos os péptidos foram caracterizados por ESI-MS e por HPLC analíticos. Na **tabela 2.3** encontram-se sumarizados os resultados obtidos.

Tabela 2.3 - Caracterização por ESI-MS e HPLC dos diferentes péptidos.

Péptido	ESI-MS		HPLC analítico		Fórmula molecular
	Teórico	Experimental	Método*	t _R (min)	
ASI-1	436.5 [M+2H] ²⁺	436.4 [M+2H] ²⁺	1	16.04	C ₅₀ H ₇₆ N ₁₆ O ₁₂
ASI-4	357.5 [M+2H] ²⁺	357.4 [M+2H] ²⁺	1	18.14	C ₂₉ H ₅₆ N ₁₄ O ₇
ASI-1a	357.7 [M+3H] ³⁺	357.8 [M+3H] ³⁺	1	7.66	C ₄₄ H ₈₃ N ₁₉ O ₁₂
	536.0 [M+2H] ²⁺	536.0 [M+2H] ²⁺			
ASI-1b	398.3 [M+3H] ³⁺	398.4 [M+3H] ³⁺	1	12.70	C ₅₁ H ₈₆ FN ₁₉ O ₁₃
	597.0 [M+2H] ²⁺	597.0 [M+2H] ²⁺			
ASI-1c	772.5 [M+Na+K+K] ²⁺	772.3 [M+Na+K+K] ²⁺	1	19.90	C ₆₀ H ₁₀₀ FN ₁₉ O ₁₉ S
ASI-1d	528.6 [M+3H] ³⁺	528.1 [M+3H] ³⁺	1	11.94	C ₇₂ H ₉₉ FN ₂₀ O ₁₈ S
	792.3 [M+2H] ²⁺	791.7 [M+2H] ²⁺			
ASI-1e	1462.0 [M+H] ⁺	1461.4 [M+H] ⁺	1	14.82	C ₆₅ H ₉₆ N ₂₀ O ₁₇ S

*Método de HPLC descrito na parte experimental (Secção 5.3.3)

*Avaliação preliminar dos
análogos de ASI-1*

3. Avaliação preliminar dos análogos de ASI-1

3.1. Lipofilia dos péptidos

O carácter lipofílico ou hidrofílico de um fármaco, ou seja, a facilidade que este tem para se dissolver mais facilmente em solventes polares ou apolares, influência a sua actividade no organismo, já que o percurso de uma droga entre o local de administração e o local de acção envolve fases aquosas e fases não aquosas. O grau de solubilidade num solvente polar indica a maior ou menor facilidade com que um composto químico atravessa as membranas biológicas. Para que um fármaco atravessasse eficazmente a membrana celular tem de haver um compromisso entre a lipofilia e a hidrofilia. Equanto que as moléculas muito lipofílicas tendem a ficar retidas em tecidos gordos e a ligarem-se com mais facilidade às proteínas plasmáticas, as moléculas hidrofílicas não atravessam eficazmente as membranas, ficam mais susceptíveis a rápida excreção e não exercem a acção farmacológica pretendida.⁷⁵

O coeficiente de partição ($\log P$) de um composto é o valor de medida usado para caracterizar a sua lipofilia, e pode ser obtido por medição directa, sendo o método de *shake flask* o mais comum, ou indirecta (por exemplo, método teórico computacional).⁷⁶ O método de *shake flask*, por agitação em ampola de decantação, consiste na dissolução da amostra (em *n*-octanol/água) e, após agitação vigorosa, há estabilização do sistema e separação das duas fases. Neste caso, o $\log P$ é o logaritmo da razão da concentração do soluto na fase orgânica e na fase aquosa. Contudo, esta técnica tem algumas desvantagens, nomeadamente a morosidade no processo, a necessidade de grandes quantidades de composto, e o facto de só poder ser usada em compostos com $\log P$ entre -2 e +4, ou seja, não pode ser usada em compostos muito hidrofóbicos nem muito hidrofílicos.⁷⁵ Como alternativa, desenvolveram-se outras técnicas indirectas para obter o $\log P$, nomeadamente a criação de programas computacionais que prevêm a lipofilia pela correlação de vários parâmetros moleculares e da contribuição individual dos átomos ou fragmentos que constituem o composto analisado.⁷⁶ Outro método indirecto de determinação da lipofilia de um composto é usando a cromatografia líquida de alta

eficiência em fase reversa (HPLC-RP), correlaciona o logP com um parâmetro cromatográfico, o factor de retenção (k'). Tendo em conta a lipofilia da fase estacionária, os compostos hidrofóbicos têm maior tempo de retenção que os hidrofílicos, por analogia com o que ocorre nas membranas dos sistemas biológicos. No entanto, este método necessita de grandes quantidades de composto, e é apenas indicado para compostos com logP entre 0 e 6.⁷⁶

Assim, escolheu-se determinar o logP dos análogos de **ASI-1** por métodos computacionais. Foram seleccionados dois programas diferentes: o programa *QikProp* (<http://isp.ncifcrf.gov/files/isp/uploads/2010/07/qikprop.pdf>, consultado a 25 Maio de 2013) e o programa *ALOGS 2.1*⁷⁷.

Normalmente, pode-se agrupar os valores de lipofilia em três grupos: baixa lipofilia ($\log P \leq 1.5$), lipofilia moderada ($1.5 < \log P \leq 4$) e lipofilia elevada ($\log P > 4$). Normalmente, uma lipofilia elevada aumenta a internalização celular, mas também conduz a uma fixação elevada em tecidos não-alvo.⁷⁶ Na **tabela 3.1** estão listados os valores de logP dos péptidos sintetizados nesta tese.

Tabela 3.1. Valores computacionais de logP dos péptidos **ASI-1**, **ASI-4** e **ASI-1 (a-e)**.

Péptido	LogP
ASI-1	-5.24
ASI-4	-3.23
ASI1-a	-6.19
ASI1-b	-5.38*
ASI1-c	-5.67
ASI1-d	-2.70*
ASI1-e	-3.95

*O valor apresentado corresponde à média entre os valores de logP obtidos com os programas *ALOGS 2.1* e *QikProp* (secção 5.5.1).

Todos os péptidos apresentam valores de logP muito baixos, e por isso têm baixa lipofilia. Todos têm valores de logP menores que -2, o que comprova que nem o método

de *shake flask* nem o de HPLC-RP eram métodos passíveis de serem aplicados para determinação do logP destes compostos.

Apesar dos valores de logP dos péptidos descritos nesta tese serem negativos, podemos constatar que há algumas diferenças entre os valores de logP. Por exemplo, o **ASI-1** apresenta um dos valores mais baixos de logP, o que era expectável devido à presença dos vários grupos amina, o seu carácter é portanto muito hidrofílico. É provável que a pH fisiológico (7.4) as aminas se encontrem protonadas, aumentando ainda mais a hidrofília do **ASI-1**. O **ASI-1a** apresenta um logP ainda menor, e este aumento na hidrofília deve-se à adição dos resíduos de lisina e β -alanina com os grupos amina livres. Já a introdução do anel de fluorobenzoíl aumentou o logP do **ASI-1b** por comparação com o homólogo sem o anel (**ASI-1a**). Este resultado não é surpreendente uma vez que a incorporação de um halogéneo na estrutura de uma molécula pode afectar consideravelmente a sua farmacocinética ao provocar um aumento considerável na sua lipofília. Por outro lado, a conjugação da ϵ -amina da lisina e do N-terminal do péptido com o flúorbenzoíl e o composto fluorescente (FITC), respectivamente, provoca um aumento significativo do valor de logP do **ASI-1d**. Tal efeito não se verificou no **ASI-1c**, já que o N-terminal, neste caso, foi conjugado a uma molécula rica em grupos hidroxilos. A conjugação da FITC aos péptidos contribui para um valor de logP mais alto, e por isso prevê-se que os péptidos com a fluoresceína sejam mais lipofílicos.

3.2. Interacção, *in vitro*, do ASI-1d com a alfa-sinucleína

A conjugação de um fluoróforo (FITC) ao péptido **ASI-1b** levou à formação do **ASI-1d**. A presença deste composto fluorescente no **ASI-1d** possibilita a realização de estudos de interacção, *in vitro*, do mesmo com a α -sin (monómeros e fibras).

Foi preparada uma solução de **ASI-1d** em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0.5%. Inicialmente determinou-se o máximo de excitação e de emissão do **ASI-1d**. Sabendo que a FITC tem uma máximo de excitação e emissão de aproximadamente 495nm e 521 nm⁴⁸, respectivamente, fez-se uma aquisição no intervalo de 300 a 700 nm. Determinou-se que o péptido tem um λ_{em} de 527 nm e um λ_{max} de 498 nm. Estes valores são congruentes, uma vez que são semelhantes aos descritos para FITC⁴⁸, como expectável.

Após determinação dos λ_{max} e o λ_{em} do **ASI-1d**, estudou-se a capacidade de ligação deste péptido aos monómeros e às fibras de α -sin, numa concentração de monómeros e fibras de 1.4 μM . Aos 0 minutos, observou-se um aumento na intensidade de fluorescência quando o péptido foi incubado com fibras de α -sin. No entanto, não houve qualquer alteração da intensidade quando o péptido foi incubado com monómeros de α -sin (**Gráfico 3.1**). Repetiu-se o estudo com o dobro da concentração de fibras (2.8 μM) para perceber se o aumento de fluorescência observado era realmente devido à interacção do péptido com as fibras. Constatou-se que com o dobro da concentração de fibras de α -sin houve um aumento mais significativo da intensidade de fluorescência, sugerindo interacção do péptido **ASI-1d** com as fibras (**Gráfico 3.2**).

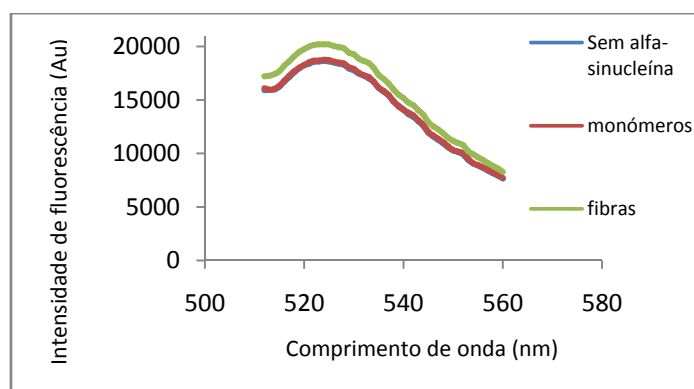


Gráfico 3.1. Espectro de fluorescência do **ASI-1d** na ausência e presença de monómeros e fibras de α -sin (1.4 μM) (0 min).

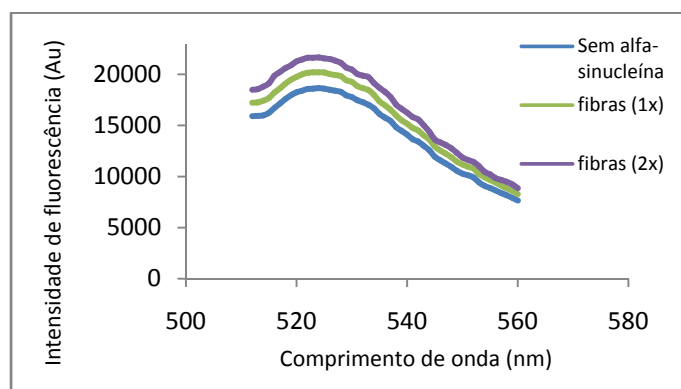


Gráfico 3.2. Espectro de fluorescência do **ASI-1d** na ausência e presença de fibras de α -sin (1.4 μM e 2.8 μM) (0 min).

Foi medida também a fluorescência do **ASI-1d** sem e com monómero e fibras de α -sin a outros tempos (24, 62, 93 e 134 min). Inicialmente (0 min), a intensidade de fluorescência do **ASI-1d**, quando incubado com os monómeros de α -sin, não se altera. No entanto, com o passar do tempo o perfil altera-se e a intensidade da fluorescência também aumenta, tal como ocorreu com as fibras (**Gráfico 3.3**).

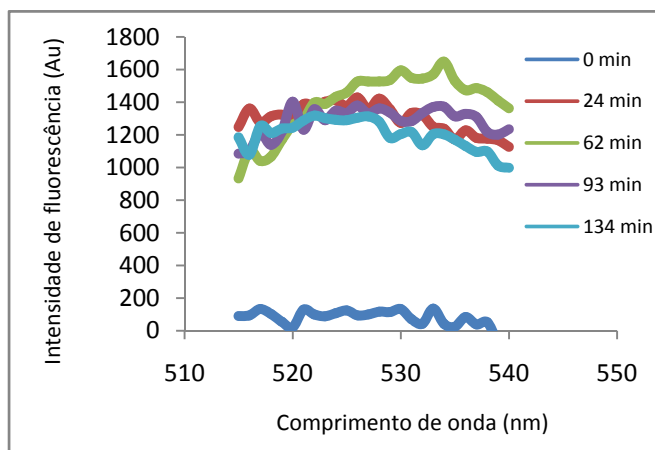


Gráfico 3.3. Espectro de fluorescência do **ASI-1d** na presença de monómeros de α -sin a diferentes tempos.

Pelo contrário, quando o péptido **ASI-1d** foi incubado com fibras de α -sin, a intensidade de fluorescência diminui com o passar do tempo, para valores semelhantes aos observados quando o péptido foi incubado com a forma monomérica (**Gráfico 3.4**).

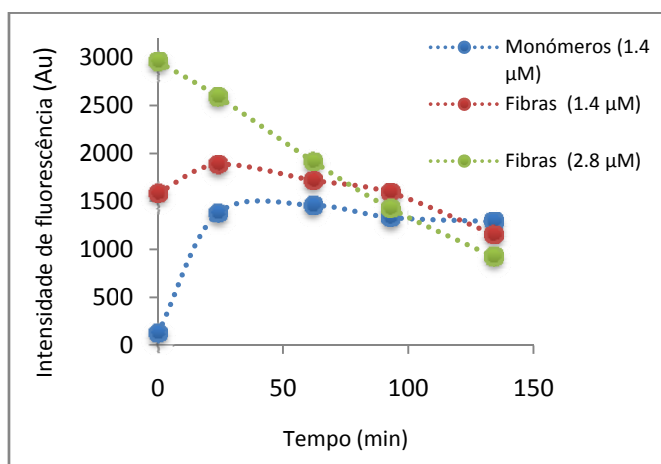


Gráfico 3.4. Relação entre o tempo de incubação e a intensidade de fluorescência do **ASI-1d**.

Estes resultados preliminares não são conclusivos, uma vez que o **ASI-1d** parece interagir quer com fibras de α -sin, quer com os monómeros à medida que aumenta o tempo de incubação. Deste modo, será necessário realizar mais estudos de interação do **ASI-1d** com a α -sin, de forma a perceber melhor a cinética dessa interacção.

3.3. Estabilidade metabólica *in vitro* do péptido ASI-1d

Um factor importante a ter em conta quando se desenvolve um composto com potencial aplicação clínica é a avaliação da sua estabilidade metabólica *in vitro*. A estabilidade do composto deve ser estudada preferencialmente em solução aquosa e a pH fisiológico.⁷⁸ Deste modo, a estabilidade do péptido **ASI-1d** foi estudada à temperatura fisiológica (37°C), em homogenados de fígado e rim de ratinhos saudáveis e em soro humano de um indivíduo saudável.⁷⁹

3.2.1. Estabilidade em fígado de ratinho

A estabilidade do **ASI-1d** foi avaliada em homogenado de fígado por este órgão ser rico em proteases e outras enzimas e responsável pela metabolização de um grande número de fármacos.

Inicialmente adoptou-se uma estratégia em que, após a incubação do péptido no homogenado de fígado, as proteínas eram precipitadas com MeOH numa relação 1:1. No entanto, nesta relação, o MeOH não era suficiente para precipitar todas as proteínas, conforme foi evidenciado por cromatograma de HPLC de apenas homogenado de fígado (sem péptido). Por conseguinte, precipitou-se a solução de péptido com homogenado com o dobro do MeOH, já que se comprovou, por HPLC, que esta relação era suficiente para precipitar todas as proteínas hepáticas.

A análise do homogenado de fígado evidenciou que o péptido é pouco estável à metabolização hepática, uma vez que após 5 minutos de incubação a 37°C só 31% do péptido **ASI-1d** (t_R = 13.13 minutos) se mantém intacto (**Figura 3.1**), havendo o

aparecimento de um metabolito mais hidrofílico ($t_R = 12.19$ minutos). Aos 30 minutos de incubação apenas 13% do péptido está intacto, e aos 60 minutos apenas 5% do **ASI-1d** não foi metabolizado, tendo-se, entretanto, formado uma nova espécie, esta mais lipofílica ($t_R = 14.71$ minutos), para além da que já se tinha formado aos 5 minutos.

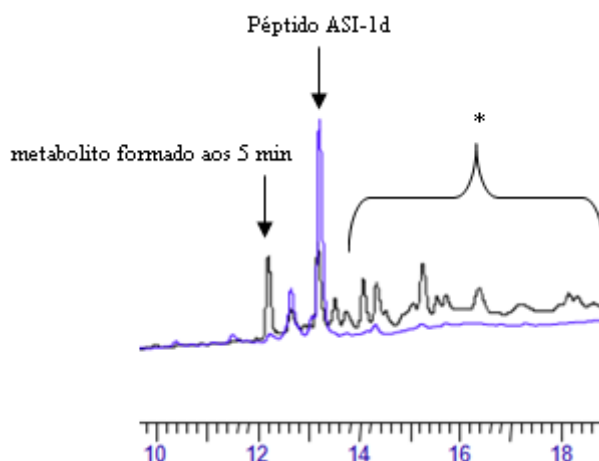


Figura 3.1. Estabilidade do péptido **ASI-1d** em homogenado de fígado. Espectro de HPLC representativos do péptido em MeOH (linha azul), e da fracção solúvel do péptido após 5 minutos de incubação a 37°C em homogenado de fígado (linha preta) (ampliação do cromatograma entre 10-18 minutos).

*Picos residuais provenientes do homogenado de fígado correspondentes a espécies não proteicas existentes na fracção solúvel do homogenado

3.2.2. Estabilidade em rim de ratinho

A análise dos cromatogramas de HPLC obtidos para as fracções solúveis (precipitação proteica com MeOH 1:1) do péptido **ASI-1d** em homogenado de rins de ratinho mostra que o péptido é bastante mais estável nos rins do que no fígado. De facto, após 60 min de incubação a 37°C, cerca de 85% do péptido **ASI-1d** ($t_R = 13.45$ minutos) ainda não foi metabolizado. Observa-se a formação de um metabolito mais lipofílico ($t_R = 15.47$ minutos).

3.2.3. Estabilidade em soro humano

No estudo da estabilidade do **ASI-1d** em soro humano a precipitação da fracção proteica do soro com MeOH na relação 1:1 ou 1:2 (usada nos homogenados de rim e fígado, respectivamente) mostrou não ser suficiente para precipitar todas as proteínas existentes no soro, observando-se, de entre outros, um pico de elevada intensidade, correspondendo provavelmente à albumina, cujo tempo de retenção coincidia com o do péptido **ASI-1d**. Quando em alternativa ao MeOH se passou a precipitar as proteínas do soro com EtOH na relação 1:2 esse pico desapareceu mas o cromatograma de HPLC apresentava, ainda assim, vários picos residuais (ainda presentes para maiores relações de EtOH) que poderiam vir a interferir com picos correspondentes a metabolitos do péptido. Foi então estudado o perfil cromatográfico do soro humano precipitado com EtOH (1:2) a comprimentos de onda superiores a 220 nm (λ usado nos estudos anteriores). Desse estudo, seleccionou-se o comprimento de onda de 280 nm por ser o que conduzia a menos picos residuais e de menor intensidade, e ainda assim permitir uma absorvância razoável do péptido (Método 5, descrito na secção 5.3.3).

A análise dos cromatogramas de HPLC obtidos para as fracções solúveis (precipitação proteica com EtOH 1:2) do péptido em soro humano mostra que o péptido apresenta boa estabilidade metabólica no soro. Após uma hora de incubação a 37°C, 51% do péptido ainda estava presente na forma intacta ($t_R = 14.88$ minutos) indicativo de $t_{1/2} \approx 1h$. Após 4 horas, a metabolização do péptido é quase completa (99%) (**Gráfico 3.2**). Os metabolitos formados são mais lipofílicos (por exemplo, $t_R = 16.87; 18.38; 20.73$ min) (**Figura 3.2**).

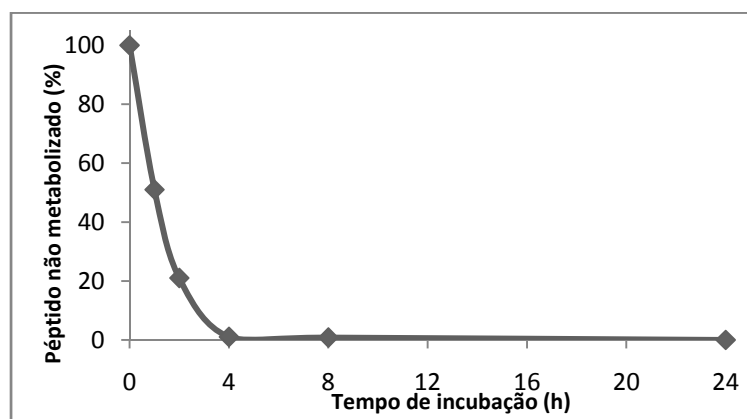


Gráfico 3.5. Metabolização do péptido **ASI-1d** em soro humano.

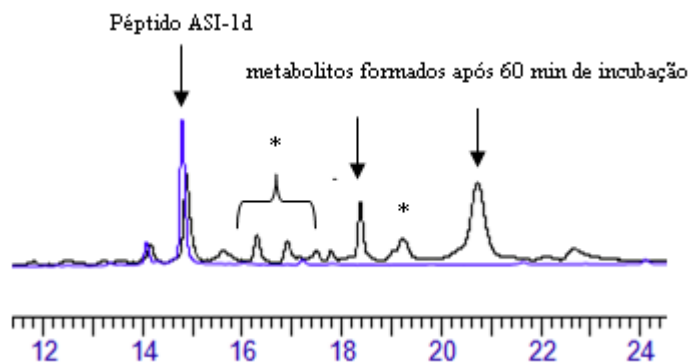


Figura 3.2. Estabilidade do péptido **ASI-1d** no soro humano. Espectro de HPLC representativo do: péptido ASI-1d (linha azul) e da fracção solúvel após 60 minutos de incubação do péptido em soro a 37°C (linha preta) (ampliação do cromatograma entre 12-24 minutos).

*Picos residuais provenientes do soro correspondentes a espécies não proteicas existentes na fracção solúvel do homogenado.

Em resumo, o péptido **ASI-1d** demonstrou possuir características adequadas para prosseguir com o estudo dos seus análogos, já que é relativamente estável no sangue e rins. A instabilidade hepática é uma característica comum a vários compostos peptídicos, não sendo um factor determinante, já que este é relativamente estável em soro humano. No entanto, dado a sua instabilidade hepática, seria relevante estudar os restantes análogos de **ASI-1**, de modo a perceber se há alguma correlação entre a estrutura dos análogos e a sua metabolização hepática, e assim concluir que características estruturais poderão aumentar a sua estabilidade *in vitro*.

*Considerações finais e
perspectivas*

4. Considerações finais e perspectivas

Com esta tese pretendia-se contribuir para o desenvolvimento de compostos específicos para a α -sin. A oligomerização e agregação de moléculas de α -sin tem um papel muito relevante na perda e disfunção neuronal características da DP e da demência dos LBs.⁸⁰ As doenças neurodegenerativas, como a DP, são, indubitavelmente, um problema crescente na sociedade actual, dado o aumento da esperança média de vida. Os mecanismos da maioria dessas doenças ainda não estão totalmente esclarecidos, mas têm-se feito esforços crescentes na predição e cura das mesmas.⁸¹ Compostos que interactivam com esta proteína podem ser usados em terapia e/ou imagiologia para agregados de α -sin. Entre os vários compostos reportados na literatura, os péptidos apresentam a grande vantagem de serem específicos, ao contrário das pequenas moléculas e dos “tweezers” moleculares.^{25,28}

Neste trabalho concebeu-se uma família de péptidos derivados do **ASI-1**. O **ASI-1** é um péptido que demonstrou, *in vitro*, ligação à α -sin, inibindo a sua agregação.² A concepção de péptidos como agentes terapêuticos é desafiante, devido à sua fraca estabilidade metabólica. Numa tentativa de conferir maior estabilidade metabólica aos péptidos estes foram concebidos com os C- e N-terminais funcionalizados. Como o objectivo a longo prazo é de preparar compostos radiofluorados para imagiologia, neste trabalho sintetizaram-se derivados fluorados do **ASI-1**. Pretendia-se avaliar, *in vitro*, os análogos inactivos com α -sin (monomérica e oligomérica). Caso os resultados obtidos nesses estudos sejam promissores, far-se-á a radiofluoração com ^{18}F -SFB dos mesmos e realizar-se-ão estudos *in vivo*.

Os péptidos **ASI-1**, **ASI-4**, e **ASI-1a** foram sintetizados automaticamente em fase sólida usando a estratégia do grupo Fmoc. O análogo **ASI-1b** foi sintetizado a partir do **ASI-1** por conjugação sequencial do derivado fluorado da Fmoc- Lys-OH (**2.27**), hidrólise selectiva do Fmoc e conjugação do Fmoc- β Ala-OH. O **ASI-1b** foi o precursor para a síntese dos restantes análogos funcionalizados no N-terminal. A síntese do **ASI-1b** com o derivado **2.27** constitui uma abordagem inovadora para a funcionalização de péptidos no resíduo de lisina, já que, normalmente, a síntese de péptidos fluorados é realizada através da reacção do ácido fluorado activado com o péptido. A síntese de **2.27** foi bem

conseguida, e com a prévia derivatização da lisina evitaram-se os possíveis problemas que outras estratégias apresentam (como condições de pH restritas). Esta estratégia também pode ser usada para a síntese de péptidos iodados, por exemplo, em que se derivatiza o resíduo de lisina com um iodobenzoíl.

Como a passagem de péptidos pela BHE ainda é um obstáculo, preparou-se um análogo do **ASI-1** que contém, para além do grupo fluorado, um derivado da glucose (tioglucosídeo). A síntese do tioglucosídeo foi conseguida com sucesso apenas quando se usou pentacetato de glucose enantiomérica pura na conformação β como reagente de partida. A reacção do grupo carboxilo da parte aglicona do tioglucosídeo **2.33** com o N-terminal do **ASI-1b**, com concomitante formação de uma ligação amida, produziu eficientemente o glicopéptido **ASI-1c**. Por outro lado, a conjugação selectiva do **ASI-1b** com a FITC ocorreu através de uma ligação tioreia e levou à formação do derivado **ASI-1d** como produto principal.

Estudos de fluorescência *in vitro* com o **ASI-1d** permitiram avaliar a ligação do mesmo aos monómeros e fibras de α -sin. Estes estudos indicam uma ligação às fibras e aos monómeros dependente do tempo de incubação. Será necessário realizar estudos adicionais, com variação da concentração do **ASI-1d**.

Começou-se a avaliação da estabilidade metabólica pelo **ASI-1d**. Os estudos foram realizados em homogenados de fígado e rins, e em soro humano. Tal como a maioria dos péptidos⁷⁹, o **ASI-1d** revelou ser pouco estável em relação à metabolização hepática. No entanto, o péptido revelou ser estável na primeira hora em soro humano, o que perspectiva que possa alcançar e atravessar a BHE antes de ser totalmente metabolizado por via hepática. Tendo em conta a fraca estabilidade metabólica no fígado do **ASI-1d**, uma estratégia que poderá ser adoptada no futuro é o uso de aminoácidos na conformação D. Os aminoácidos-D são menos sensíveis às proteases,^{2,82,83} mais resistentes à degradação em animais e menos imunogénicos do que os aminoácidos naturais.⁸³ Outra estratégia para aumentar a estabilidade dos péptidos é o uso de derivados de aminoácidos *N*-metilados.² A avaliação da estabilidade metabólica dos restantes análogos será realizada num futuro próximo.

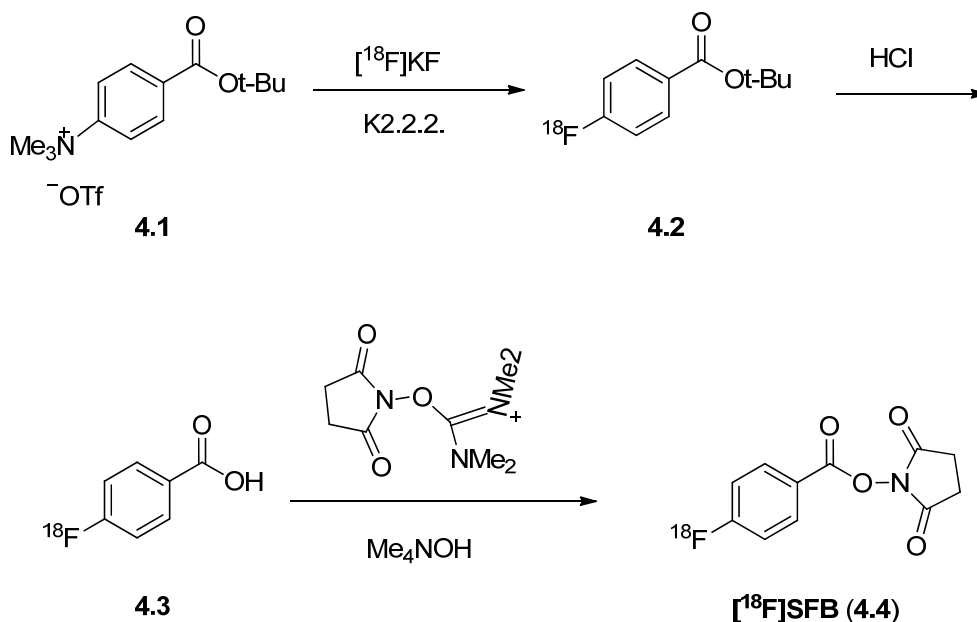
Será avaliada posteriormente a capacidade de inibir a agregação e/ou promover a desagregação de fibras pré-formadas dos péptidos sintetizados nesta tese. Para esse estudo utilizar-se-á α -sin recombinante, produzida no grupo do Dr Tiago Outeiro, no Instituto de Medicina Molecular. Este trabalho envolverá directamente a participação do Dr Hugo Miranda e colaboradores. Os péptidos têm de ser avaliados nas mesmas condições, uma vez que se usa α -sin recombinante, por isso sua avaliação tem de ser simultânea. Esta é a razão pela qual esta avaliação ainda não se realizou.

O glicopéptido (**ASI-1c**) será estudado num modelo que mimetiza a BHE de forma a avaliar se a glicosilação dos péptidos é uma estratégia eficiente para a passagem dos análogos **ASI-1** por esta barreira. Se esta estratégia se vier a revelar facilitadora da passagem pela BHE, poder-se-á fazer um análogo do **ASI-1c** radiofluorado, já que a marcação de péptidos biologicamente activos com radionuclídeos é uma área que tem vindo a ganhar destaque em imagiologia nuclear.⁸⁴

Como já foi referido acima, caso os resultados com os análogos inactivos sejam promissores, far-se-á a radiofluoração dos péptidos.

O flúor-18 (^{18}F) é o radioisótopo ideal para aplicação em PET devido às suas propriedades nucleares e físicas: tempo de semi-vida curto (109.8 min) e uma penetração de positrões linear nos tecidos curta (2.3 mm).⁸⁵ As pequenas moléculas são tipicamente radiofluoradas por uma reacção $\text{S}_{\text{N}}2$. Para isso, o precursor tem de conter um bom grupo abandonante (ex: OTs, OTf), que é substituído pelo fluoreto radioactivo ^{18}F .⁸⁶ Contudo, esta estratégia não é viável para radiofluorar moléculas complexas como péptidos, oligonucleótidos e anticorpos devido à desnaturação dos mesmos em solventes orgânicos mais sensíveis e/ou à presença de protões ácidos. Nesses casos, o ^{18}F é introduzido por reacção da molécula bioactiva com um grupo prostético radiofluorado pré-formado. O ^{18}F -SFB é um dos grupos prostéticos mais explorados para radiofluoração de péptidos.⁸⁷ O ^{18}F -SFB reage quase exclusivamente com resíduos de lisina através da formação de ligações amida estáveis. Para além disso, o ^{18}F -SFB apresenta uma estabilidade *in vivo* elevada.⁸⁸ Esta estratégia será adequado para a preparação dos análogos **ASI-1** radiofluorados através da conjugação do ^{18}F -SFB à ϵ -amina da lisina presente nesses análogos.

Existem várias estratégias reportadas para a síntese do ^{18}F -SFB.^{86,87,89} Quando radiomarcarmos com ^{18}F os péptidos descritos nesta tese a estratégia de síntese será a reportada no **Esquema 4.1**.



Esquema 4.1. Síntese de [^{18}F]-SFB.⁸⁹

Após a formação do *terço*-butil 4-[^{18}F] fluorobenzoato (**4.2**), a partir do sal de triflato do *terço*-butil 4- N,N,N -trimetilamoniumbenzoato (**4.1**), faz-se a subsequente hidrólise ácida do éster para se obter o 4-[^{18}F] ácido fluorobenzóico (**4.3**). O ácido **4.3** é depois convertido em ^{18}F -SFB (**4.4**) por reacção com O -(N -succinimidil)- N,N,N',N' -tetrametilurónio tetrafluoroborato, seguido de purificação do produto radiofluorado por HPLC. Com este método de síntese o ^{18}F -SFB é obtido em rendimento radioquímico e pureza radioquímica excelentes. Esta reacção é realizada num módulo de síntese automático.⁸⁹ No futuro, pretende-se radiofluorar alguns dos péptidos **ASI-1a-NHFmoc** e **ASI-1e**, sintetizados nesta tese, para prepara o ^{18}F -**ASI-1b** e ^{18}F -**ASI-1d**, respectivamente.

Os resultados preliminares obtidos nesta tese mostraram-se promissores, uma vez que o **ASI-1d** mostrou capacidade de se ligar às fibras de α -sin, em adição a uma estabilidade moderada no soro. O estudo posterior dos péptidos preparados nesta tese poderá proporcionar uma melhor compreensão do tipo de ligação destes com a α -sin. Poderá também indicar o interesse dos análogos ASI-1 como compostos radioactivos para a detecção de α -sin, quando marcados com ^{18}F .

Experimental

5. Experimental

5.1. Aspectos gerais

A manipulação de reagentes e/ou compostos químicos sensíveis ao ar ou à humidade foi efectuada sob atmosfera inerte, recorrendo à utilização de linhas de vazío e de técnicas de Schlenk.

A manipulação dos reagentes e/ou compostos químicos foi realizada segundo as boas práticas de laboratório. O risco e segurança da utilização dos mesmos foram consultados previamente à sua utilização. Antes dos procedimentos reaccionais, foi preenchida uma ficha de dados de segurança dos reagentes utilizados.

5.2. Solventes e Reagentes

Todos os solventes e reagentes químicos utilizados nas reacções eram de qualidade pró análise e foram usados sem qualquer purificação adicional, excepto nos casos em que é indicado. O éter de petróleo usado tem p.e. 40-60°C. Os solventes foram secos e destilados segundo procedimentos descritos⁹⁰.

A resina Ambertite® IR-120 (Wassertoff-Form) foi lavada com metanol e seca sob vácuo.

5.3. Técnicas de Purificação e Caracterização

5.3.1. Cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina (TLC) foi utilizada para monitorizar as reacções de síntese química e para identificar os produtos de reacção. Utilizaram-se tiras de sílica-gel 60-F254 (Merck) em suporte de alumínio sensíveis a radiação de comprimento de onda de 254 nm. A revelação dos cromatogramas foi efectuada por irradiação com luz ultra-violeta com comprimento de onda de 254 nm. Em alguns casos, a revelação foi

efectuada utilizando uma solução de ninidrina (3% p/v numa solução de 5% de ácido acético em metanol), e/ou com uma solução de 10% H₂SO₄/EtOH seguidas de aquecimento, e/ou uma câmara de iodo (I₂).

5.3.2. Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna foi realizada para purificar alguns dos compostos sintetizados. Utilizou-se sílica gel 60, com granulometria 70-230 mesh ASTM (Merck). As colunas de vidro, com tamanho adequado à quantidade de amostra a purificar, foram cheias com uma mistura de sílica gel e de eluente. O sistema de eluentes utilizado foi seleccionado de acordo com as características (polaridade) dos compostos a purificar. Após aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi efectuada por acção da gravidade, com o eluente previamente seleccionado, e recolhidas fracções com volume adequado. Aliquotas das fracções recolhidas foram analisadas por TLC de modo a seleccionar as fracções que continham o produto a isolar. As fracções que continham o produto puro foram juntas e secas sob vácuo no evaporador rotativo (Büchi) e/ou na linha de vazio.

5.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Pressão

A análise e purificação dos péptidos foram efectuadas no sistema de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) equipado com uma bomba Perkin-Elmer LC 200 e um detector de UV/visível Perkin-Elmer LC 290, e/ ou um sistema HPLC da Waters 2535 Quaternary Gradient. Todos os solventes utilizados eram de qualidade HPLC. A água utilizada para a preparação dos solventes aquosos foi bi-destilada em aparelho de quartzo. Os solventes foram filtrados por filtro Nucleopore de 0,22 µm e desaerificados com hélio ou com aparelho adequado para o efeito (*Vacum degasser* Perkin series 200). As condições experimentais foram seleccionadas de acordo com as características dos compostos a analisar e/ou purificar e serão referidas sempre que oportuno para cada um dos compostos em particular. Os perfis cromatográficos foram obtidos por detecção da absorvância a 220 nm (Método 1-4) ou 280 nm (Método 5).

Os controlos analíticos e a purificação dos péptidos (amostras preparadas em água e/ou acetonitrilo (ACN)) realizaram-se segundo os seguintes métodos:

Método 1

Pré-coluna e Coluna: Supelco C18; 25 cm x 4,6 mm, 5 µm

Fluxo: 1 mL/minuto

Eluentes: (A) 0,1% TFA aquoso; (B) 0,1% TFA/ACN

Gradientes:

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0-5	90	10
5-25	0	100
25-27	0	100
27-28	90	10
28-30	90	10

Método 2

Coluna: µBondapak C18; 19 cm x 150 mm, 10 µm

Fluxo: 10 mL/minuto

Eluentes: (A) 0,1% TFA aquoso; (B) 0,1% TFA/ACN

Gradientes:

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0-5	90	10
5-30	0	100
30-37	0	100
37-38	90	10
38-41	90	10

Método 3

Coluna: μ Bondapak C18; 19 cm x 150 mm, 10 μ m

Fluxo: 10 mL/minuto

Eluentes: (A) 0,1% TFA aquoso; (B) 0,1% TFA/ACN

Gradientes:

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0-5	90	10
5-30	80	20
30-32	30	70
32-33	0	100
33-35	0	100
35-37	90	10

Método 4

Coluna: μ Bondapak C18; 19 cm x 150 mm, 10 μ m

Fluxo: 10 mL/minuto

Eluentes: (A) 0,1% TFA aquoso; (B) 0,1% TFA/ACN

Gradientes:

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0-5	90	10
5-30	90	10
30-32	0	100
32-33	0	100
33-35	90	10

Método 5

Pré-coluna e Coluna: Supelco C18; 25 cm x 4,6 mm, 5 µm

Fluxo: 1 mL/minuto

Eluentes: (A) 0,1% TFA aquoso; (B) 0,1% TFA/ACN

Gradientes:

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0-5	90	10
5-25	20	80
25-27	20	80
27-28	90	10
28-30	90	10

5.3.4. Ponto de fusão

Os pontos de fusão (p.f.) foram registados num *Stuart SMP3 melting point apparatus*. As amostras foram colocadas em tubos capilares 75 x 2.0 mm, fechados numa extremidade.

5.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear

Os espectros de ressonância magnética e nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{19}F dos compostos foram efectuados num espectrómetro Varian Unity 300 MHz, a 300 MHz, 75,4 MHz, e 281,98 MHz, respectivamente. Os espectros foram obtidos a 20°C. A atribuição dos prótons e dos carbonos foi efectuada por gCOSY e HSQC. Os desvios químicos dos espectros são dados na escala δ (ppm).

Os desvios químicos dos espectros de ^1H e de ^{13}C foram referenciados com o sinal residual dos solventes deuterados relativamente ao tetrametilsilano (TMS). Os desvios

químicos dos espectros de ^{19}F foram referenciados com uma solução externa de α,α',α'' -trifluorotolueno (0.05 % in C_6D_6 ; $\delta = -63.3$ ppm).

Na aquisição dos espectros de ^1H , de ^{13}C , e de ^{19}F verifica-se acoplamento entre os átomos de ^1H e de ^{19}F , bem como entre os átomos de ^{13}C e de ^{19}F .

Os espectros de RMN foram realizados em CDCl_3 ou em CD_3OD .

5.3.6. Análise elementar de C, H e N

As análises elementares foram efectuadas num analisador automático EA 110 CE Instruments. As análises foram efectuadas pela Vânia Sousa (CTN, IST/ITN).

5.3.7. Espectroscopia de Infravermelho

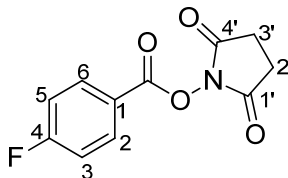
Os espectros de infravermelho (IV) foram adquiridos num espectrómetro Tensor 27 (Bruker). As amostras foram preparadas sob a forma de pastilha de KBr e de CsI.

5.3.8. Espectrometria de Massa

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro ESI/QITMS Bruker HCT, através de Ionização por Electrospray. As amostras foram dissolvidas em metanol, com uma concentração de 10^{-4} M. A espectrometria de massa foi realizada pelo Dr. Joaquim Marçalo e Dr^a Célia Fernandes.

5.4. Síntese dos compostos não-peptídicos

5.4.1. Síntese do *N*-succinimidil-4-fluorobenzoato (**2.22**)



A uma solução de ácido 4-fluorobenzóico (100 mg, 0.7 mmol) em acetonitrilo (4 mL) foi adicionado *N,N*-disuccinimidil carbonato (186 mg, 0.7 mmol) e trietilamina (0.2 mL). A reacção foi agitada à t.a. durante 3.5 horas. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (DCM 100%), obtendo-se o composto **2.22** (147 mg, η = 87%) na forma de sólido branco.

R_f (DCM) = 0.4

p.f.: 113-115°C

^1H -RMN (CDCl_3) δ : 2.93 (s, 4H, $\text{CH}_2^{2'} + \text{CH}_2^{3'}$), 7.37 (dd, 2H, $\text{CH}^3 + \text{CH}^5$, $^3J_{\text{H-F}} = 8.7$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 8.7$ Hz), 8.24 (dd, 2H, $\text{CH}^2 + \text{CH}^6$, $^4J_{\text{H-F}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 8.7$ Hz).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 25.59 ($\text{C}^{2'} + \text{C}^{3'}$), 116.26 (d, $\text{C}^3 + \text{C}^5$, $^2J_{\text{C-F}} = 22.7$ Hz), 121.24 (d, C^1 , $^4J_{\text{C-F}} = 3.1$ Hz), 133.33 (d, $\text{C}^2 + \text{C}^6$, $^3J_{\text{C-F}} = 9.6$ Hz), 160.86 (C=O éster), 166.78 (d, C^4 , $^1J_{\text{C-F}} = 257.79$ Hz), 169.20 ($\text{C}^{1'} + \text{C}^{4'}$).

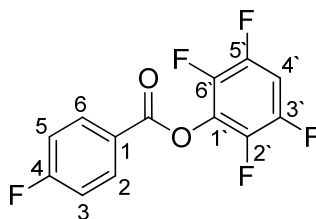
^{19}F -RMN (CDCl_3) δ : -101.62 (m).

Análise elementar (%) para $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FNO}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$ (246.19 g mol^{-1})

Teórico: C 53.66, H 3.68, N 5.69; Experimental: C 53.55, H 3.99, N 5.65.

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 1770, 1733, 1603, 1260, 1238, 1216, 752 cm^{-1} .

5.4.2. Síntese do tetrafluorofenil-4-fluorobenzoato (2.24)



A uma solução de ácido 4-fluorobenzoico (1.5 g, 10.7 mmol) em dioxano (50 mL) adicionou-se *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (2.6 g, 12.8 mmol) e tetrafluorofenol (2.7 g, 16.1 mmol). A reacção foi agitada à t.a. durante 90 min. A DCU formada foi removida por filtração e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O crude da reacção foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel (acetato de etilo/éter de petróleo, 1:4) obtendo-se uma mistura do composto **2.24** contaminado com DCU. Essa mistura foi re-purificada por cristalização (éter petróleo em DCM) a 4°C, obtendo-se o composto **2.24** puro (2.7 g, η = 88%) na forma de cristais esbranquiçados.

R_f (acetato de etilo /éter petróleo, 1:4) = 0.76

p.f.: 89-92 °C

^1H -RMN (CDCl_3) δ : 6.98 (m, 1H, $\text{CH}^{4'}$), 7.15 (dd, 2H, $\text{CH}^3 + \text{CH}^5$, $^3J_{\text{H,H}} = 8.7$ Hz, $^3J_{\text{H-F}} = 8.7$ Hz), 8.17 (dd, 2H, $\text{CH}^2 + \text{CH}^6$, $^3J_{\text{H-H}} = 8.7$ Hz, $^4J_{\text{H-F}} = 5.1$ Hz).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 103.38 (t, $\text{C}^{4'}$, $^2J_{\text{C-F}} = 22.7$ Hz), 116.21 (d, $\text{C}^3 + \text{C}^5$, $^2J_{\text{C-F}} = 22.1$ Hz), 123.37 (d, C^1 , $^4J_{\text{C-F}} = 3.1$ Hz), 133.37 (d, $\text{C}^2 + \text{C}^6$, $^3J_{\text{C-F}} = 10.2$ Hz), 140.78 (m), 146.09 (m), 161.60 (C=O), 166.72 (d, C^4 , $^1J_{\text{C-F}} = 257.3$ Hz).

^{19}F -RMN (CDCl_3) δ : -153.22 (m, 2F), -139.30 (m, 2F), -102.65 (m, 1F, F^4).

Análise elementar (%) para $\text{C}_{13}\text{H}_5\text{F}_5\text{O}_2$ (288,18 g mol^{-1}):

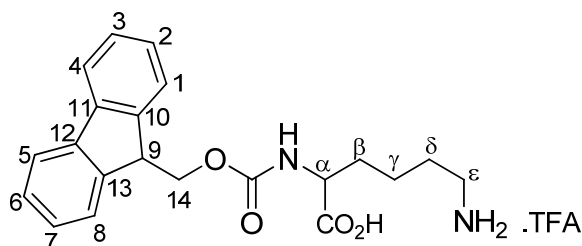
Teórico: C 54.18, H 1.75, Experimental: C 54.21, H 1.64.

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 3091, 1759, 1603, 1283, 1240, 1076, 756 cm^{-1} .

5.4.3. Hidrólise do grupo protector da ϵ -amina

Uma solução de *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -*t*-Boc-D-Lisina (200 mg, 0.4 mmol) em TFA (6 mL) foi agitada à t.a. durante uma noite. Em seguida, o solvente foi seco em linha de vazio, obtendo-se o ácido 2-*N*-Fmoc-6-aminohexanoico (**2.26**) na forma de óleo amarelo, com um rendimento quantitativo.

Ácido 2-(((9H-fluoreno-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-aminohexanoico (Fmoc-Lys-OH) (2.26)



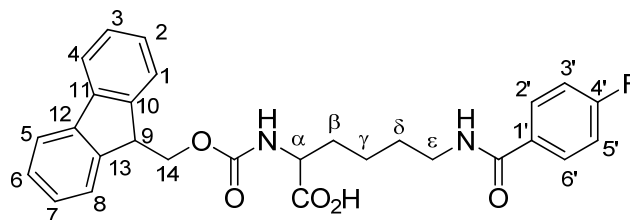
$R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}, 90:8:2) = 0.11$

^1H -RMN (CD_3OD) δ : 1.48 (m, 2H, CH_2^γ), 1.60 (m, 2H, CH_2^δ), 1.83 (m, 1H, CH_2^β), 2.82 (t, 2H, CH_2^ϵ , $J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz), 4.15 (t, 1H, CH^α , $J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz), 4.24 (t, 2H, CH_2^9 , $J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz), 4.31 (d, 1H, CH^{14} , $J_{\text{H-H}} = 7.0$ Hz), 7.22 (dd, 2H, $\text{CH}^2 + \text{CH}^7$, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz), 7.31 (dd, 2H, $\text{CH}^3 + \text{CH}^6$, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz), 7.57 e 7.59 (2d, 2H, CH^1 e CH^8 , $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz), 7.71 (d, 2H, $\text{CH}^4 + \text{CH}^5$, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz).

^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 23.87 (C^γ), 27.99 (C^δ), 32.12 (C^β), 40.48 (C^ϵ), 48.38 (C^{14}), 54.90 (C^α), 67.93 (C^9), 120.94 ($\text{C}^4 + \text{C}^5$), 126.21 ($\text{C}^1 + \text{C}^8$), 128.15 ($\text{C}^2 + \text{C}^7$), 128.80 ($\text{C}^3 + \text{C}^6$), 145.22 ($\text{C}^{10} + \text{C}^{13}$), 147.59 ($\text{C}^{11} + \text{C}^{12}$), 158.76 (C=O carbamato), 175.65 (C=O ácido carboxílico),

IV (CsI) $\nu_{\text{máx}}$: 3409, 3061, 2948, 1703, 1678, 1189 cm^{-1} .

5.4.4. Síntese do ácido 2-((((9H-fluoreno-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(4'-fluorobenzoato)hexanoíco (Fmoc-Lys(4-fluorobenzoíl)-OH) (2.27)



5.4.4.1. Método A

Uma solução de Fmoc-Lys-OH.TFA (100 mg, 0.2 mmol) em DMF (2 mL) foi agitada com DIPEA (73 μ L, 0.4 mmol) a 0°C durante 30 min. De seguida, adicionou-se o composto **2.22** (99.5 mg, 0.4 mmol) e a mistura reaccional foi agitada à t.a. durante 2 horas. Por fim, a mistura foi neutralizada com uma solução de HCl 2M (0.5 mL). Em seguida, a mistura reaccional foi diluída em água (30 mL) e extraída com acetato de etilo (2 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi seco por evaporação do solvente a pressão reduzida. O crude resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (MeOH/DCM, 5:95 \rightarrow 10:90), obtendo-se o composto **2.27** (48 mg, η = 47%) na forma de sólido branco.

5.4.4.2. Método B

Uma solução de Fmoc-Lys-OH.TFA (1.1 g, 2.2 mmol) em DMF (21 mL) foi agitada com DIPEA (0.8 mL, 4.4 mmol) a 0°C durante 30 min. De seguida, adicionou-se o composto **2.24** (1.3 g, 2.2 mmol) e a mistura reaccional foi agitada à t.a. durante 2 horas. Por fim, a mistura foi neutralizada com uma solução de HCl 2M (5.4 mL). Em seguida, a mistura reaccional foi diluída com água (30 mL) e extraída com acetato de etilo (2 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi seco por evaporação do solvente a pressão reduzida. O crude resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (MeOH/DCM, 5:95 \rightarrow 10:90), obtendo-se o composto **2.27** (790 mg, η = 72%) na forma de sólido branco.

R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH, 90:8:2) = 0.57

p.f.: 158-166 °C

¹H-RMN (CD₃OD) δ : 1.54 (m, 2H, CH₂ ^{γ}), 1.69 (m, 2H, CH₂ ^{δ}), 1.93 (m, 2H, CH₂ ^{β}), 3.42 (t, 2H, CH₂ ^{ϵ} , J_{H-H} = 5.7 Hz), 4.17 (t, 1H, CH ^{α} , J_{H-H} = 4.8 Hz), 4.24 (t, 1H, CH ^{θ} , J_{H-H} = 6.9 Hz), 4.37 (d, 2H, CH₂ ^{ι} , J_{H-H} = 6.9 Hz), 7.17 (dd, 2H, CH ^{$3'$} + CH ^{$5'$} , $^3J_{H-H}$ = 8.7 Hz, $^3J_{H-F}$ = 8.7 Hz), 7.33 (dd, 2H, CH ^{2} + CH ^{7} , $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz, $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz), 7.42 (dd, 2H, CH ^{3} + CH ^{6} , $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz, $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz), 7.69 e 7.71 (2d, 2H, CH ^{8} e CH ^{1} , $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz), 7.83 (d, 2H, CH ^{4} + CH ^{5} , $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz), 7.89 (dd, 2H, CH ^{$2'$} + CH ^{$6'$} , $^3J_{H-H}$ = 8.7 Hz, $^4J_{H-F}$ = 5.4 Hz).

¹³C-RMN (CD₃OD) δ : 24.39 (C ^{γ}), 29.98 (C ^{δ}), 32.42 (C ^{β}), 40.77 (C ^{ϵ}), 42.23 (C ^{θ}), 55.26 (C ^{α}), 67.95 (C ^{ι}), 116.33 (d, C ^{$3'$} + C ^{$5'$} , $^2J_{C-F}$ = 22.1 Hz), 120.91 (C ^{4} + C ^{5}), 126.26 (C ^{1} + C ^{8}), 128.17 (C ^{2} + C ^{7}), 128.79 (C ^{3} + C ^{6}), 130.82 (d, C ^{$2'$} + C ^{$6'$} , $^3J_{C-F}$ = 9.1 Hz), 142.38 (C ^{10} + C ^{13}), 144.93 (C ^{11} + C ^{12}), 145.12 (d, C ^{$1'$} , $^4J_{C-F}$ = 3.1 Hz), 159.22 (C=Oamida), 163.65 (C=Ocarbamato), 167.70 (d, C ^{$4'$} , $^1J_{C-F}$ = 257.56 Hz), 175.83 (C=O ácido carboxílico).

¹⁹F-RMN (CD₃OD) δ : -107.44 (m).

ESI-MS (+) C₂₈H₂₇FN₂O₅ (490) (m/z) (%) 491 [M+H]⁺ (14), 513 [M+Na]⁺ (100)

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 3321, 2963, 2882, 1707, 1688, 1618, 1240, 1105, 737 cm⁻¹.

5.4.5 Acetilalação dos grupos hidroxilos da D-glucose

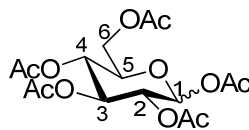
5.4.5.1 Método A

A uma solução de D-glucose (1.0 g, 5.6 mmol) em piridina (5 mL) foi adicionado anidrido acético (5 mL) e a mistura reaccional foi agitada à t.a. durante 24 h. Em seguida, foi adicionado metanol (50 mL) e a reacção continuou por mais 1 h. Após concentração do solvente sob pressão reduzida, o crude da reacção foi dissolvido em DCM (100 mL) e extraído com uma solução saturada de NaHCO₃ (100 mL). A fase orgânica foi seca em MgSO₄ anidro e filtrada. Após evaporação do filtrado, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (acetato de etilo/éter de petróleo 1:1), obtendo-se o 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α,β -D-glucose (1.9 g, η = 85%) numa relação anomérica α/β de 81:19.

5.4.5.2 Método B

A uma solução de D-glucose (1.0 g, 5.6 mmol) em ácido acético (10 mL) foi adicionado anidrido acético (3.2 mL) e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A mistura reaccional foi agitada à t.a. durante 1 hora. Em seguida, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O crude da reacção foi dissolvido em DCM (100 mL) e extraído com uma solução saturada de NaHCO₃ (100 mL). A fase orgânica foi seca em MgSO₄ anidro e filtrada. O filtrado foi evaporado à secura, obtendo-se o 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- α,β -D-glucose (2.1 g, η = 98%) numa relação anomérica α/β de 51:49.

1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α , β -D-glucose (2.29)



R_f (acetato de etilo/éter de petróleo, 1:1) = 0.6

1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α -D-glucose

^1H -RMN (CDCl_3) δ : 2.02, 2.03, 2.04, 2.05 e 2.19 (5s, 15H, 5OAc), 3.90 (m, 1H, CH^5), 4.08 (dd, 1H, CH^{6a} , $J_{\text{H}6a-\text{H}5} = 2.3$ Hz, $J_{\text{H}6a-\text{H}6b} = 12.3$ Hz), 4.25 (dd, 1H, CH^{6b} , $J_{\text{H}6b-\text{H}5} = 4.2$ Hz, $J_{\text{H}6a-\text{H}6b} = 12.6$ Hz), 5.07 (dd, 1H, CH^2 , $J_{\text{H}2-\text{H}1} = 3.8$ Hz, $J_{\text{H}2-\text{H}3} = 9.5$ Hz), 5.11 (dd, 1H, CH^4 , $J_{\text{H}4-\text{H}3} = 9.6$ Hz, $J_{\text{H}4-\text{H}5} = 9.9$ Hz), 5.44 (dd, 1H, CH^3 , $J_{\text{H}3-\text{H}2} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H}3-\text{H}4} = 9.6$ Hz), 6.33 (d, 1H, CH^1 , $J_{\text{H}1-\text{H}2} = 3.8$ Hz).

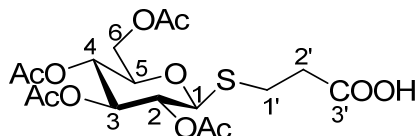
^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 20.14, 20.26, 20.34, 20.38, 20.56 (5 C^{Ac}), 61.16 (C^6), 67.44 (C^4), 68.88 (C^2), 69.50 (C^3), 72.42 (C^5), 88.73 (C^1), 168.63, 169.10, 169.36, 169.88, 170.27 (5 $\text{C}=\text{O}$ Ac).

1,2,3,4,6-penta-O-acetil- β -D-glucose

^1H -RMN (CDCl_3) δ : 2.02, 2.03, 2.04, 2.05 e 2.19 (5s, 15H, 5OAc), 3.90 (m, 1H, CH^5), 4.08 (dd, 1H, CH^{6a} , $J_{\text{H}6a-\text{H}5} = 2.3$ Hz, $J_{\text{H}6a-\text{H}6b} = 12.3$ Hz), 4.25 (dd, 1H, CH^{6b} , $J_{\text{H}6b-\text{H}5} = 4.2$ Hz, $J_{\text{H}6a-\text{H}6b} = 12.6$ Hz), 5.07 (dd, 1H, CH^2 , $J_{\text{H}2-\text{H}1} = 8.6$ Hz, $J_{\text{H}2-\text{H}3} = 9.5$ Hz), 5.11 (dd, 1H, CH^4 , $J_{\text{H}4-\text{H}3} = 9.6$ Hz, $J_{\text{H}4-\text{H}5} = 9.9$ Hz), 5.23 (1H, CH^3 , $J_{\text{H}3-\text{H}2} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H}3-\text{H}4} = 9.6$ Hz), 5.69 (d, 1H, CH^1 , $J_{\text{H}1-\text{H}2} = 8.6$ Hz)

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 20.45, 20.58, 20.69 (5 C^{Ac}), 61.31 (C^6), 67.60 (C^4), 70.08 (C^2), 72.57 (C^3), 72.64 (C^5), 91.55 (C^1), 168.84, 169.12, 169.26, 169.97, 170.47 (5 $\text{C}=\text{O}$ Ac).

5.4.6. Síntese do ((2'-carboxi)etil)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-tio-β-D-glucopiranosido (2.31)



A uma solução de β-D-glucose pentaacetato (1.0 g, 2.6 mmol) em DCM anidro (24 mL) foi adicionado o boro trifluoreto dietil eterado (BF₃.Et₂O) (0.5mL, 3.9 mmol) seguido do ácido 3-mercaptopropiónico (0.9 mL, 10.4 mmol). A mistura reaccional foi agitada à t.a, sob atmosfera de azoto, durante 21h. Em seguida, a mistura foi extraída com acetato de etilo (3 x 50 mL) e uma solução saturada de NaCl (50 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi concentrado a pressão reduzida. O crude resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (acetato de etilo/éter petróleo 1:1), obtendo-se o composto **2.31** (990 mg, η = 89%) na forma de sólido amarelado.

R_f (acetato de etilo/éter petróleo, 1:1) = 0.11

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1.95, 1.97, 1.99 e 2.03 (4s, 12H, 4OAc), 2.71 (t, 2H, CH₂^{2'}, *J*_{H-H}= 6.8 Hz), 2.88 (m, 2H, CH₂^{1'}, *J*_{H-H}= 6.8 Hz), 3.64 (m, 1H, CH⁵), 4.08 (dd, 1H, CH^{6a}, *J*_{H6a-H5} = 2.6 Hz, *J*_{H6a-H6b} = 12.5 Hz), 4.18 (dd, 1H, CH^{6b}, *J*_{H6b-H5} = 4.8 Hz, *J*_{H6b-H6a} = 12.5 Hz), 4.48 (d, 1H, CH¹, *J*_{H1-H2} = 9.9 Hz), 4.97 (dd, 1H, CH², *J*_{H2-H3} = 9.3 Hz, *J*_{H2-H1} = 9.9 Hz), 5.01 (dd, 1H, CH⁴, *J*_{H4-H3} = 9.5 Hz, *J*_{H4-H5} = 9.9 Hz), 5.16 (dd, 1H, CH³, *J*_{H3-H2} = 9.3 Hz, *J*_{H3-H4} = 9.5 Hz).

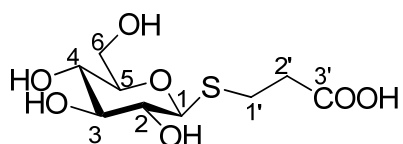
¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 20.45, 20.53, 20.55, 20.90 (4 C^{Ac}), 25.19 (C^{1'}), 35.10 (C^{2'}), 62.00 (C⁶), 68.31 (C⁴), 69.47 (C²), 73.56 (C³), 75.62 (C⁵), 83.74 (C¹), 169.38, 169.59, 170.13, 170.75 (4 C=O Ac), 176.62 (C^{3'}).

ESI-MS (-) C₁₇H₂₄O₁₁S (436) (*m/z*) (%): 471 [M+Cl]⁻ (100), 435 [M-H]⁻ (56%)

5.4.7. Hidrólise dos grupos acetatos

A uma solução de **2.31** (0.75 g, 1.70 mmol) em MeOH (14 mL) foi adicionada uma solução de NaOH (1.4 g, 35.0 mmol) em água (26 mL). A mistura reaccional foi agitada à t.a. durante 36 h. Após completa hidrólise dos grupos acetato, a mistura reaccional foi neutralizada com resina Amberlite® IR-120 até pH = 5. Em seguida, a resina foi filtrada e lavada copiosamente com MeOH. Após evaporação do solvente a pressão reduzida, o (3'carboxietil)-2,3,4,6-tetra-*O*-hidroxil-1-tio-β-D-glucopiranosido (**2.33**) (248 mg, η = 76%) foi recuperado na forma de óleo castanho.

((2' carboxi)etil)-2,3,4,6-tetra-*O*-hidroxil-1-tio-β-D-glucopiranosido (**2.33**)



R_f (acetato de etilo/éter petróleo, 1:1) = 0.09

¹H-RMN (CD₃OD) δ: 2.73 (t, 2H, CH₂^{2'}, J_{H-H} = 7.1 Hz), 2.99 (m, 2H, CH₂^{1'}, J_{H-H} = 7.1 Hz), 3.22 (dd, 1H, CH², J_{H2-H3} = 8.4 Hz, J_{H2-H1} = 9.6 Hz), 3.34-3.41 (m, 3H, CH³, CH⁴, CH⁵), 3.71 (dd, 1H, CH^{6b}, J_{H6b-H5} = 5.4 Hz, J_{H6b-H6a} = 12.0 Hz), 3.89 (dd, 1H, CH^{6a}, J_{H6a-H5} = 1.5 Hz, J_{H6a-H6b} = 12.0 Hz), 4.44 (d, 1H, CH¹, J_{H1-H2} = 9.6 Hz)

¹³C-RMN (CD₃OD) δ: 26.12 (C^{1'}), 35.62 (C^{2'}), 62.85 (C⁶), 74.22 (C²), 71.38, 79.46 e 81.88 (C³, C⁴ e C⁵), 87.17 (C¹), 174.46 (C^{3'}).

ESI-MS (-) C₉H₁₆O₇S (268) (*m/z*) (%): 267 [M-H]⁻ (35%)

5.5. Síntese das sequências peptídicas

5.5.1. Síntese de péptidos

Os diferentes péptidos foram sintetizados em fase sólida, usando a estratégia do grupo Fmoc. Como suporte sólido foi usada a resina Rink amide MBHA (0.59 mmol/g; 100-200 mesh; Merck).

Os péptidos **ASI-1**, **ASI-4**, e **ASI-1a** foram sintetizados na íntegra num sintetizador automático de péptidos com um microondas acoplado (Liberty, CEM). Os aminoácidos utilizados no sintetizador estavam disponíveis comercialmente (CEM, Carolina do Norte, USA), e na seguinte forma:

- Fmoc-Ala-OH (A)
- Fmoc- β Ala-OH (β A)
- Fmoc-Arg (Pbf)-OH (R)
- Fmoc-Gly-OH (G)
- Fmoc-Lys (Boc)-OH (K)
- Fmoc-Thr (*t*Bu)-OH (T)
- Fmoc-Val-OH (V)

Para a formação da ligação peptídica foi usado o HBTU (2.5 eq) em DMF (0.19 g HBTU/mL) como reagente de acoplamento e DIPEA (5 eq) em *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) (0.54 mL DIPEA/mL) como base. O grupo Fmoc foi hidrolisado usando uma solução de piperidina a 20% em DMF.

Os péptidos **ASI-1b**, **ASI-1c**, **ASI-1d** e **ASI-1e** foram sintetizados manualmente a partir da sequência Arg(Pbf)-Gly-Gly-Ala-Val-Val-Thr(*t*Bu)-Gly-Arg(Pbf)-Fmoc ligada à resina. Esta peptídil resina foi recolhida do sintetizador automático, lavada copiosamente com DCM, e seca sob a linha do vazio. Em seguida, a resina foi transferida para um equipamento adequado para síntese manual de péptidos. Após o *swelling* da resina com DCM durante 15-30 minutos, o grupo Fmoc foi hidrolisado com piperidina a 20% em DMF. Nestas condições, as reacções de acoplamento foram efectuadas por meio da activação com HBTU (2.5 eq) e HOBt (2.5 eq) em DMF com o α -amino ácido adequado (2.5 eq), usando DIPEA (5 eq) como base. Cada acoplamento,

com duração de 1 hora, foi repetido, seguido da desprotecção com piperidina a 20% em DMF do grupo Fmoc (dois ciclos de 30 min). Estas duas etapas foram repetidas sucessivamente até adição e posterior desprotecção do último resíduo de aminoácido. Entre cada etapa a resina foi lavada copiosamente com DMF.

5.5.1.1 Teste de Kaiser

Os acoplamentos e desprotecções realizados manualmente foram monitorizados pelo teste de Kaiser. Este teste consiste na transferência de uma quantidade mínima da peptídil-resina para um tubo, à qual se adicionam:

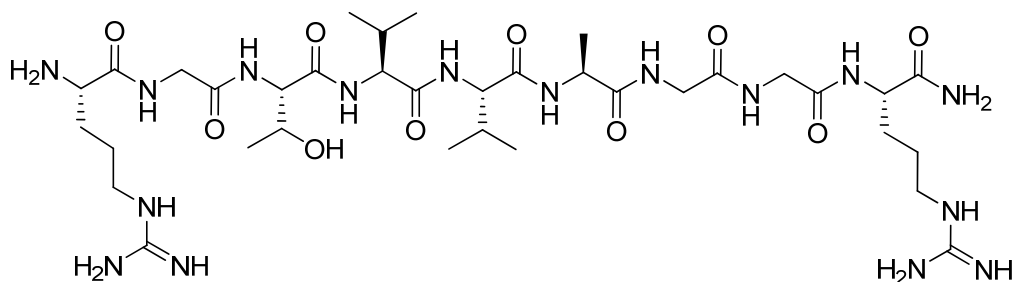
- duas gotas de solução de ninidrina a 5% em etanol (w/v);
- uma gota de solução de fenol a 80% em etanol (w/v);
- uma gota de solução de KCN em piridina (2 mL 0.001M KCN/98 mL piridina).

A solução é aquecida a 120°C durante 3-5 minutos. A presença de α -amino grupos desprotegidos é indicada pela coloração azul intensa da resina, devido à formação do complexo de Ruheman (ver **Esquema 2.3**, composto **19**). Quando o α -amino grupo está protegido a resina apresenta coloração castanha.

5.5.1.2 Hidrólise ácida

No fim da síntese, a hidrólise da resina e dos grupos protectores foi realizada usando uma solução de TFA/Tis/H₂O (95:2.5:2.5, v:v:v) (10-25 mL solução/g resina), a temperatura ambiente. Após 4 horas de reacção, a resina foi filtrada e lavada com TFA seguido de DCM. A solução contendo o péptido foi concentrada em linha de vazio. De seguida, foi adicionado éter dietílico frio para precipitar o péptido e para remover os grupos protectores e o agente sequestrante de radicais livres (Tis). O péptido foi centrifugado e após separação do sobrenadante, foi re-dissolvido em água e liofilizado. O péptido foi purificado por HPLC de acordo com o método seleccionado (descrito em 5.3.3). O solvente orgânico da fracção recolhida foi evaporado em linha de vazio, e a fase aquosa foi liofilizada. Por fim, o péptido foi caracterizado por HPLC analítica e ESI-MS.

5.5.2. Péptido ASI-1 (2.34)



Péptido **ASI-1**: R-G-G-A-V-V-T-G-R-NH₂

Peso molecular: 871 gmol⁻¹ (C₃₅H₆₆N₁₆O₁₀)

ESI-MS (+) C₃₅H₆₆N₁₆O₁₀ (871) (*m/z*) (%): 436.4 [M+2H]²⁺ (100%)

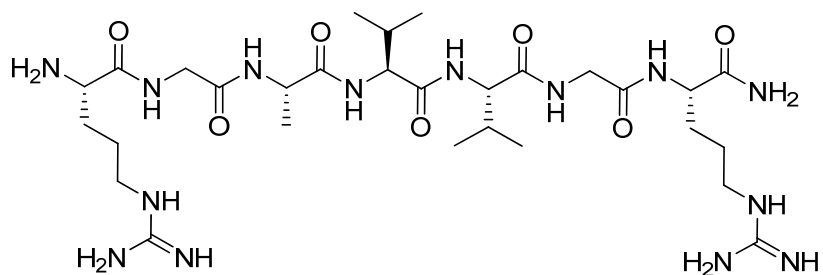
ESI-MS (+) C₅₀H₇₆N₁₆O₁₂ (1093) (*m/z*) (%): 1093.7 [M+H]⁺ (100%)

HPLC analítico: Método 1; t_R = 16.04 min (péptido desprotegido), 23.30 min (péptido com *N*-Fmoc terminal)

HPLC preparativo: Método 2; t_R = 19.96 min (péptido desprotegido),

LogP: -5.24 (*ALOGPS 2.1.*)

5.5.3. Péptido ASI-4 (2.35)



Péptido **ASI-4**: R-G-A-V-V-G-R-NH₂

Peso molecular: 713 gmol⁻¹ (C₂₉H₅₆N₁₄O₇)

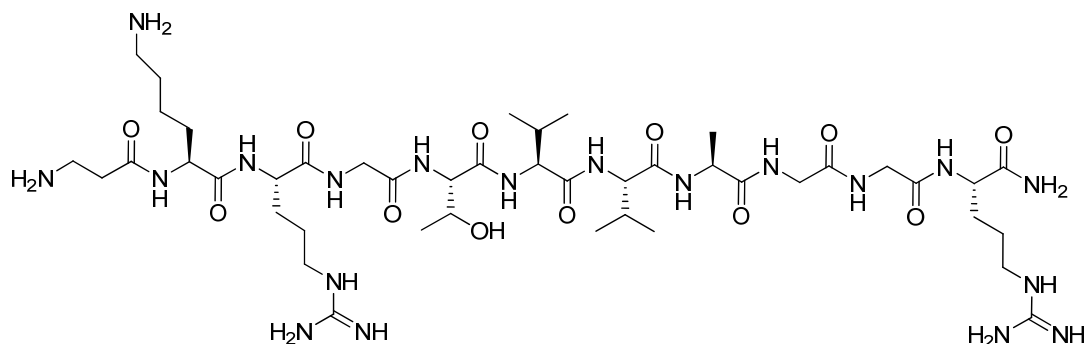
ESI-MS (+) C₂₉H₅₆N₁₄O₇ (713) (*m/z*) (%): 357.4 [M+2H]²⁺ (100%)

HPLC analítico: Método 1; t_R = 18.14 min

HPLC preparativo: Método 3; t_R = 28.76 min

LogP: -3.23 (*ALOGPS 2.1.*)

5.5.4. Péptido ASI-1a (2.36)



Péptido **ASI-1a**: R-G-G-A-V-V-T-G-R-K-βA-NH₂

Peso molecular: 1070 g mol⁻¹ (C₄₄H₈₃N₁₉O₁₂)

ESI-MS (+) C₄₄H₈₃N₁₉O₁₂ (1070) (*m/z*) (%): 357.8 [M+3H]³⁺ (85); 536.0 [M+2H]²⁺ (100)

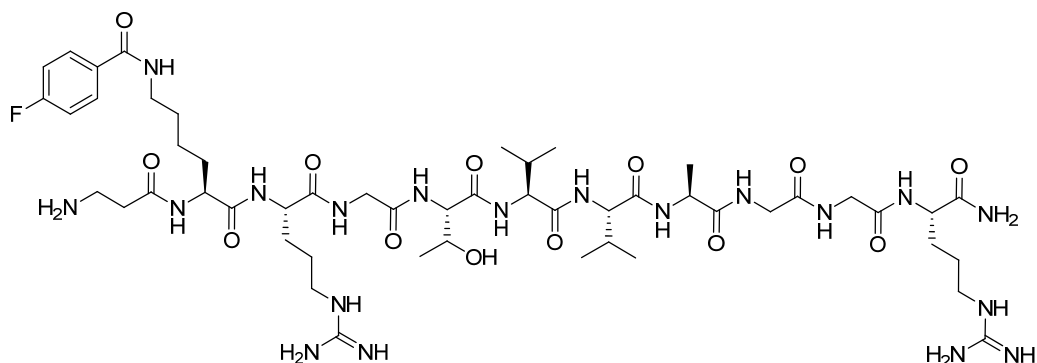
ESI-MS (+) C₅₉H₉₃N₁₉O₁₄ (1292) (*m/z*) (%): 431.7 [M+3H]³⁺ (65); 647.0 [M+2H]²⁺ (100)

HPLC analítico: Método 1; t_R = 7.66 min (péptido desprotegido), 16.0 min (péptido com *N*-Fmoc terminal)

HPLC preparativo: Método 2; t_R = 3.97 min (péptido desprotegido)

LogP: -6.19 (programa *ALOGPS 2.1.*)

5.5.5. Péptido ASI-1b (2.37)



Péptido ASI-1b: R-G-G-V-V-T-G-R-K(fluorobenzoíl)- β A-NH₂

Peso molecular: 1192 gmol⁻¹ (C₅₁H₈₆FN₁₉O₁₃).

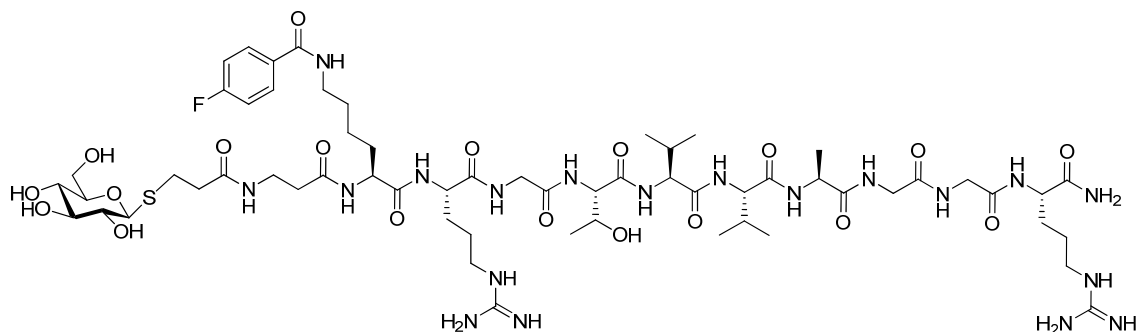
ESI-MS (+) C₅₁H₈₆FN₁₉O₁₃ (1192) (*m/z*) (%): 398.4 [M+3H]³⁺ (68); 597.0 [M+2H]²⁺ (100)

HPLC analítico: Método 1; t_R = 12.70 minutos.

HPLC preparativo: Método 2; t_R = 13.22 minutos.

LogP: - 4.56 (ALOGPS 2.1.); - 6.20 (QikProp).

5.5.6. Péptido ASI-1c (2.38)



Péptido **ASI-1c**: R-G-G-A-V-V-T-G-R-K (4-fluorobenzoíl)-βA-(3' carboxietil) tioglicosido

Peso molecular: 1443 gmol⁻¹ (C₆₀H₁₀₀FN₁₉O₁₉S).

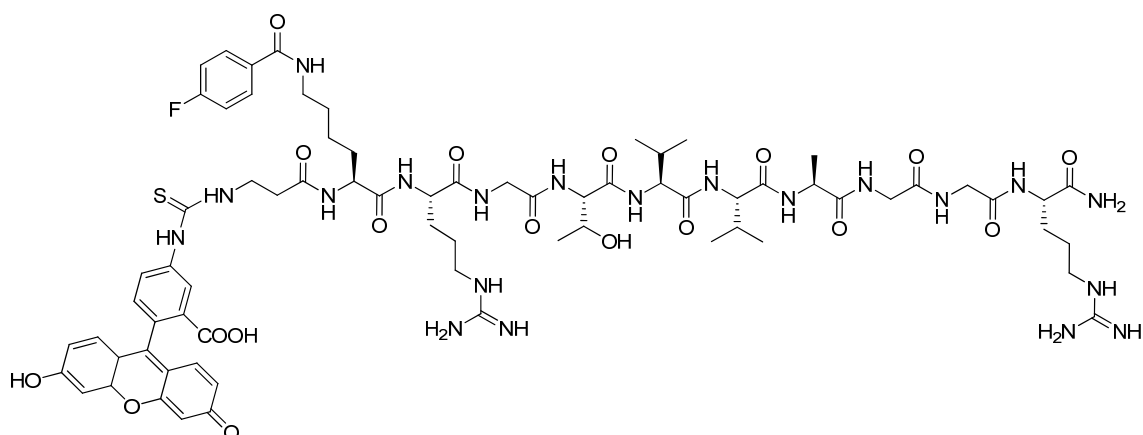
ESI-MS (+) C₆₀H₁₀₀FN₁₉O₁₉S (1443) (*m/z*) (%): 772.3 [M+Na+2K]²⁺ (100)

HPLC analítico: Método 1; t_R = 19.90 minutos.

HPLC preparativo: Método 4; t_R = 20.85 minutos.

LogP: -5.67 (ALOGPS 2.1.)

5.5.7. Péptido ASI-1d (2.39)



Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (2.5 eq) foi adicionado ao péptido Arg(Pbf)-Gly-Gly-Ala-Val-Val-Thr(*t*Bu)-Gly-Arg(Pbf)-Lys(4-fluorobenzoíl)-βAla ligado à resina na presença de DIPEA (5 eq) em DMF sob corrente de azoto durante 2 h. Em seguida, a resina foi manipulada tal como descrito em 5.5.1.2, obtendo-se o péptido **ASI-1d**: R-G-A-V-V-T-G-R-K(4-fluorobenzoíl)-βA-FITC.

Peso molecular: 1583 g mol⁻¹ (C₇₂H₉₉FN₂₀O₁₈S).

ESI-MS (+) C₇₂H₉₉FN₂₀O₁₈S (1583) (*m/z*) (%): 528.1 [M+3H]³⁺ (20); 791.7 [M+2H]²⁺ (100)

HPLC analítico: Método 1; *t_R* = 11.94 minutos.

HPLC preparativo: Método2; *t_R* = 17.43 minutos.

LogP: -2.41 (ALOGPS 2.1.); -2.99 (QikProp).

5.6. Estudos de fluorescência

Os estudos de fluorescência foram realizados no Instituto de Medicina Molecular, com a ajuda do Dr. Hugo Miranda, no grupo “Cell and Molecular Neuroscience Unit”. Os monómeros e fibras de α -sin foram feitos nesse grupo.

Suspendeu-se o péptido **ASI-1d** numa solução de DMSO a 0.5%.

Preparou-se uma solução teste inicial (branco) com 50 μ L de DMSO e 50 μ L de solução tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)-HCl (30 mM, pH=7.4). Retiraram-se 20 μ L da solução teste para o poço 1, numa placa preta do tipo *Corning 96 Flat Bottom Black Polystyrol*.

Colocou-se num segundo poço (poço 2) 20 μ L de uma solução de péptido, de volume final 200 μ L, com uma concentração de 35 μ M de péptido.

Num equipamento *Tecan Infinite 200* determinou-se o comprimento de onda de emissão e absorção do péptido. Os resultados obtidos foram de 498 nm (absorção) e 527 nm (emissão).

De seguida, prepararam-se três soluções distintas:

- 200 μ L de uma solução de péptido (17.5 μ M);
- 200 μ L de uma solução de péptido+monómeros de α -sin (1.4 μ M);
- 200 μ L de uma solução de péptido+fibras de α -sin (1.4 μ M).

Colocaram-se as três soluções (20 μ L cada) no poço 3, 4 e 5 e fez-se medição, de modo a avaliar se a intensidade de fluorescência do péptido se altera na presença de monómeros e fibras de α -sin. Para ver a reprodutibilidade do processo, fizeram-se mais dois poços de cada uma das três soluções. Fizeram-se, ainda, três poços com uma solução de péptido+fibras de α -sin com o dobro da concentração de fibras (2.8 μ M).

As várias medições foram repetidas em diferentes tempos: 0, 24, 62, 93 e 134 min.

5.7. Estudos de estabilidade/metabolismo *in vitro*

Os estudos de metabolização *in vitro* foram efectuados em homogenados de rim e fígado de ratinho fêmea da estirpe outbred da Charles River, CD-1, adquiridos na IFFA CREDO, Espanha. As condições experimentais de realização dos ensaios satisfaziam as orientações técnicas relativas ao alojamento e cuidados a prestar a pequenos roedores aprovadas na Portaria 1131/97 para aplicação dos Decretos-Lei nº 129/92 de 6 de Julho e 197/96 de 16 de Outubro que transpõem para a ordem jurídica interna a Directiva comunitária nº 86/609/CEE que estabelece as normas relativas à protecção de animais para fins experimentais e outros fins científicos. No decorrer dos ensaios os animais são mantidos com dieta normal *ad libitum*.

5.7.1. Estabilidade em fígado e rins

Imediatamente após o sacrifício, o fígado e o rim foram excisados, lavados rapidamente com tampão 50 mM TRIS/0.2 M sacarose (pH=7.4) conservado a 4°C. Os tecidos foram então homogeneizados no mesmo tampão (4 x volume do tecido), usando um homogeneizador de vidro manual do tipo clássico de Dounce. Os homogenados foram repartidos por tubos *ependorf* e usados imediatamente (a 4°C) ou guardados a -20°C. Para o ensaio, a 630 µL de homogenado (rim ou fígado) adicionou-se 70 µL de solução de péptido **ASI-1d** (1 mM), e incubou-se a 37°C. Aos 0, 5, 15, 30 e 60 min de incubação, retirou-se 100 µL da solução do homogenado com péptido, e adicionou-se 100 µL (rins) ou 200 µL (fígado) de MeOH frio de forma a precipitar a fracção proteica. Centrifugou-se a amostra a 10000 rpm, durante 7 min. O sobrenadante foi analisado por HPLC pelo Método 1, já descrito em 5.3.3.

5.7.2. Estabilidade em soro humano

O sangue humano de um sujeito saudável foi recolhido em tubos de vidro. Após a sua coagulação, o soro foi obtido por centrifugação a 3000 rpm, durante 10 min, a 4°C, e repartido e armazenado a -20°C em tubos de polipropileno.

A 630 μL de soro adicionaram-se 70 μL de solução de péptido **ASI-1d** (1 mM), e incubou-se a 37°C.

Aos 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h e 24h de incubação, retirou-se uma alíquota e adicionou-se o dobro do volume de EtOH frio. De seguida, centrifugou-se a amostra 12000 rpm, durante 7 min. O sobrenadante foi analisado por HPLC pelo Método 5, já descrito na secção 5.3.3.

Referências bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

1. Kadir A., Nordberg A. Target-specific PET probes for neurodegenerative disorders related to dementia. *J Nucl Med* 2010, 51 (9), 1418-1427
2. El-Agnaf O., Paleologou K., Greer B., Abogrein A., King J., Salem S., Fullwood N., Benson F., Hewitt R., Ford K., Martin F., Harriott P., Cookson M., Allsop D. A strategy for designing inhibitors of α -synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson's disease and related disorders. *FASEB J*, 2004, 18, 1315-1317
3. Guerrero E., Vasudevaraju P., Hedge M., Britton G., Rao K. Recent Advances in α -synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, 2013, 47 (2), 525-536
4. Pavese N., Brooks D. Imaging neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792 (7), 722-729
5. Brooks D. Imaging approaches to Parkinson Disease. *J Nucl Med*, 2010, 51 (4), 596-609
6. Serrano I., Ribeiro M., Castanho M. A focus on glucose-mediated drug delivery to the central nervous system. *Mini-rev Med Chem*, 2012, 12 (4), 301-312
7. Waxman E., Giasson B. Molecular mechanisms of α -synuclein neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792 (7), 616-624
8. Caruana M., Högen T., Levin J., Hillmer A., Giese A., Vassallo N. Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett*, 2011, 1113-1120
9. Bagchi D., Yu L., Perlmutter J., Xu J., Mach R., Tu Z., Kotzbauer P. Binding of the radioligand SIL23 to α -synuclein fibrils in Parkinson disease brain tissue establishes feasibility and screening approaches for developing a Parkinson disease imaging agent. *PLOS one*, 2013, 8 (2), e55031. 1-13
10. Petkova, A. T., Ishii, T., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F, A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (26), 16742-16747

11. Forman M., Lee V., Trojanowski J. Nosology of Parkinson's disease: looking for the way out of a quackmire. *Neuron*, 2005, 47, 479-482
12. Kim Y., Laurine E., Woods W., Lee S. A novel mechanism of interaction between α -synuclein and biological membranes. *J Mol Biol*, 2006, 360, 386-397
13. Ye L., Velasco A., Fraser G., Beach T., Sue L., Osredkar T., Libri V., Spillantini M., Goedert M., Lockhart A. *In vitro* high affinity α -synuclein binding sites for the amyloid imaging agent PIB are not matched by binding to Lewy bodies in postmortem human brain. *J Neurochem*, 2008, 105, 1428-1437
14. Conway K., Rochet J., Bieganski R., Lansbury P. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science*, 2001, 294, 1346-1349
15. Tomiyama T., Shoji A., Kataoka K., Suwa Y., Asano S., Kaneko H., Endo N. Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *J Biol Chem*, 1996, 271, 6839-6844.
16. Li J., Zhu M., Rajamani S., Uversky V., Fink A. Rifampicin inhibits α -synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem Biol*, 2004, 11, 1513-1521
17. Zhu M., Rajamani S., Kaylor J., Han S., Zhou F., Fink A. The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of α -synuclein and disaggregates existing fibrils. *J Biol Chem*, 2004, 279 (26), 26846-26857
18. Bae S., Kim S., Hwang H., Kim H., Yoon H., Kim J., Lee S., Kim T. Amyloid formation and disaggregation of α -synuclein and its tandem repeat (α -TR). *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400, 531-536
19. Masuda M., Suzuki N., Taniguchi S., Oikawa T., Nonaka T., Iwatsubo T., Hisanaga S., Goedert M., Hasegawa M. Small molecules inhibitors of α -synuclein filament assembly. *Biochemistry*, 2006, 45(19), 6085-6094
20. Yu W., Jiang T., Lan D., Lu J., Yue Z., Wang J., Zhou P. Trehalose inhibits fibrillation of A53T mutant alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 523, 144-150
21. Re F., Airolidi C., Zona C., Masserini M., La Ferla B., Quattrocchi N., Nicotra F. Beta amyloid aggregation inhibitors: small molecules as candidate drugs for therapy of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*, 2010, 17 (27), 2990-3006

22. Madine J., Doig A., Middleton D. Design of an N-methylated peptide inhibitor of α -synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J Am Chem Soc*, 2008, 130, 7873-7881
23. Bodles A., El-Agnaf O, Greer B., Guthrie D., Irvine G. Inhibition of fibril formation and toxicity of a fragment of α -synuclein by an N-methylated peptide analogue. *Neurosc Lett*, 2004, 359, 89-93
24. Gordon D., Sciarata K., Meredith S. Inhibition of β -Amyloid Fibrillogenesis and Disassembly of β -Amyloid Fibrils by Short β -Amyloid Congeners Containing N-Methyl Amino Acids at Alternate Residues. *Biochemistry*, 2001, 40, 8237-8245
25. Masliah E., Rockenstein E., Adame A., Alford M., Crews L., Hashimoto M., Seubert P., Lee M., Goldstein J., Chilcote T., Games D., Schenk D. Effects of α -Synuclein Immunization in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neuron*, 2005, 46, 857-868
26. Leblond J., Petitjean A. Molecular tweezers: concepts and applications. *Chemphyschem*, 2011, 12 (6), 1043-1051
27. Prabhudesai S., Sinha S., Attar A., Kotagiri A., Fitzmaurice A., Lakshmanan R., Ivanova, M., Loo J., Klärner F., Schrader T., Stahl M., Bitan G., Bronstein J. A novel "molecular tweezer" inhibitor of α -synuclein neurotoxicity in vitro and in vivo. *Neurotherapeutics*, 2012, 9, 464-476
28. Fokkens M., Schrader T., Klämer F. A molecular tweezer for lysine and arginine. *J Am Chem Soc*, 2005, 127, 14415-14421
29. Benadiba M., Luurtsema G., Wichert-Ana L., Buchpigel C., Filho G. New molecular targets for positron emission tomography (PET) and computed tomography single photon emission tomography (SPECT) in neurodegenerative diseases. *Rev Bras Psiquiatr*, 2012, 34 (2), 125-148
30. Ametamey S., Honer M., Schubiger, P. Molecular imaging with PET. *Chem Rev*, 2008, 108 (5), 1501-1516
31. Maetzler W., Reimold M., Liepelt I., Solbach C., Leyhe T., Schweitzer K., Eschweiler G., Mittelbronn M., Gaenslen A., Uebele M., Reischl G., Gasser T., Machulla H., Bares R., Berg D. [^{11}C]PIB binding in Parkinson's disease dementia. *Neuroimage*, 2008, 39 (3), 1027-1033
32. Fodero-Tavoletti M., Smith D., McLean C., Adlard P., Barnham K., Foster L., Leone L., Perez K., Cortés M., Culvenor J., Li Q., Laughton K., Rowe C.,

- Masters C., Cappai R., Villemagne V. *In vitro* characterization of Pittsburgh compound-B binding to Lewy bodies. *J Neurosci*, 2007, 27 (39), 10365-10371
33. Kikuchi A., Takeda A., Okamura N., Tashiro M., Hasegawa T., Furumoto S., Kobayashi M., Sugeno N., Baba T., Miki Y., Mori F., Wakabayashi K., Funaki Y., Iwata R., Takahashi S., Fukuda H., Arai H., Kudo Y., Yanai K., Itoyama Y. *In vivo* visualization of α -synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl) ethenyl]-6-[2-(fluoro) ethoxy] benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain*, 2010, 133 (6), 1772-1778
34. Kudo Y., Okamura N., Furumoto S., Tashiro M., Furukawa K., Maruyama M., Itoh M., Iwata R., Yanai K., Arai H. 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]Ethenyl)-6- (2-[Fluoro]Ethoxy)Benzoxazole: A Novel PET Agent for In Vivo Detection of Dense Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Patients. *J Nuc Med*, 2007, 48 (4), 553-561
35. Albericio F., Kruger H. Therapeutic peptides. *Future Med Chem*, 2012, 4(12), 1527-1531
36. Gozes I., Neuroprotective peptide drug delivery and development: potential new therapeutics. *Trends Neurosci*, 2001, 24 (12), 700-705
37. Fani M., Maecke H., Okarvi S. Radiolabeled peptides: valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics*, 2012, 2 (5), 481-501
38. Bodor N., Buchwald P. Brain-target delivery of peptides. *Am Pharm Rev*, 2008, 9 (1), 100-104
39. Bodor N., Buchwald P. Barriers to remember: brain-targeting chemical delivery systems and Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*, 2002, 7 (14), 766-774
40. Egleton R., Davis T. P. Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier. *NeuroRx*, 2005, 2 (1), 44-53
41. Meade A., Meloni B., Mastaglia F., Knuckey N. The application of cell penetrating peptides for the delivery of neuroprotective peptides/proteins in experimental cerebral ischaemia studies. *J Exp Stroke Transl Med*, 2009, 2 (1), 22-40
42. Ntziachristos V. Fluorescence Molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, 8, 1-33
43. Johnsson N., Johnsson K. Chemical tools for biomolecular imaging. *ACS Chem Biol*, 2007, 2, 31-38

44. Giepmans B., Adams S., Ellisman M., Tsien R. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 2006, 312, 217-224
45. Lakowicz J. Principles of fluorescence spectroscopy. 2006. 3rd edition. Springer, New York. Cap. 1. Pp. 1-25
46. Bassi A. Conceitos fundamentais em espectroscopia. *Chemkeys*, 2001, 1-14
47. Lavish L., Raines R. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem Biol*, 2008, 3 (3), 142-155
48. Stan D., Mihailescu C., Savin M., Matei I. 2-(2-Hydroxy-5-nitrobenzylidene)-1,3-indanedione *versus* Fluorescein Isothiocyanate in Interaction with Anti-hFABP Immunoglobulin G1: Fluorescence Quenching, Secondary Structure Alteration and Binding Sites Localization. *Int J Mol Sci*, 2013, 14, 3011-3025
49. Valeur E., Bradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev*, 2009, 38, 606-631
50. Hacking M., Sheldon R., Rantwijk F. Lipase-catalysed synthesis of carboxylic amides: Nitrogen nucleophiles as acyl acceptor. *Monatsh Chem*, 2000, 131, 549-569
51. Li X., Danishefsky S. New chemistry with old functional groups: on the reaction of isonitriles with carboxylic acids-a route to various amide types. *J Am Chem Soc*, 2008, 130 (16), 5446-5448
52. Sasaki K., Crich D. Facile amide bond formation from carboxylic acids and isocyanates. *Org Lett*, 2011, 13 (9), 2256-2259
53. Kolakowski R., Shanguan N., Sauers R., Williams L. Mechanism of tio acid/azide amidation. *J Am Chem Soc*, 2006, 128, 5695-5702
54. Shen B., Makley D., Johnston J. Umpolung reactivity in amide and peptide synthesis. *Nature*, 2010, 465, 1027-1033
55. Chan W., White P. Fmoc solid phase peptide synthesis. 1st edition. 2000. Oxford
56. Borgia J., Fields G. Chemical synthesis of proteins. *Tibtech*, 2000, 18, 243-251
57. Merrifield, B. Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. *Meth Enzymol*, 1997, 289. 3-13
58. Hyde C., Johnson T., Owen D., Quibell M., Sheppard R. C. Some “difficult sequences” made easy. *Int J Pept Protein Res*, 1994, 43, 431-440
59. Bondansky M. Peptide chemistry a practical text book. 1993. Springer-Verlag. Racemization, pp. 117-128
60. Peptide synthesis 2008/2009. Merck. Novabiochem.cap. 5.4. pp 2.22

61. Friedman M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of AminoAcids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *J Agric Food Chem*, 2004, 52, 385-406
62. Jahan M., Nag S., KrasikovaR., Weber U., Muhs A., Pfeifer A., Spenger C., Willbord D., Gulyas B., Halldin C. Fluorine-18 labeling of three novel D.peptides by conjugation with N-succinimidyl-4-[18F]fluorobenzoate and preliminary examination by postmortem whole-hemisphere human brain autoradiography. *Nucl Med Biol*, 2012, 39, 315-323
63. Silverstein R., Webster F., Kiemle D. Spectrometric identification of organic coumpounds. John Wiley & sons. 2005. 7th edition. Hoboken, New Jersey
64. Morais, G., Watanabe, M., Tanaka, Y., Thiemann, T. Simple amidation of unprotected phenol-containing 2-alkenoic acids. *J Chem Res*, 2005, 12 (6), 802-807
65. Jamous M., Haberkorn U., Mier W. Synthesis of Peptide Radiopharmaceuticals for the Therapy and Diagnosis of Tumor Diseases. *Molecules*, 2013, 18, 3379-3409
66. Isidro-Llobet A., Álvarez M., Albericio F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem Rev*, 2009, 109, 2455-2504
67. Berthelot T., Laín G., Latxague L., Déleris G. Synthesis of Novel Fluorogenic L-Fmoc Lysine Derivatives as Potential Tools for Imaging Cells. *J Fluoresc*, 2004, 14 (6), 671-675
68. Chang C-D., Waki M., Ahmad M , Meienhofer J., Lundell E.,Haug J. Preparation and properties of N⁹-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert.-butyl side chain protection. *Int J Pept Protein Res*, 1980, 15, 59-66
69. Morais G., Humphrey A., FalconerR. Application of HOF-CH₃CN to the synthesis of glycosyl sulfone. *Tetrahedron*, 2008, 64, 7426-7431
70. Hunsen M., Long D., D'Ardenne C., Smith A. Mild one-pot preparation of glycosyl bromides. *Carbohydr Res*, 2005, 340, 2670-2674
71. Bennett S., Vonitzstein M., Kiefel M. A simple method for the preparation of thioglycosides of N-acetylneuraminic acid. *Carbohydr Res*, 1994, 259, 293-299
72. Fujihira T., Takido T., Seno M. Synthesis of alkyl and arylthioglycosides and thiodisaccharides via thioiminium salts in a two-phase system. *J Mol Catal A*, 1976, 137 (1), 65-75

73. Ferrier R., Furneaux R. Synthesis of 1,2-trans-related 1-thioglycoside esters. *Carbohydr Res*, 1976, 52 (1), 63–68
74. Amer D., Irvine G., El-Agnaf O. Inhibitors of α -synuclein oligomerization and toxicity: a future therapeutic strategy for Parkinson's disease and related disorders. *Exp Brain Res*, 2006, 173, 223-233
75. Czyrski A., Kupczyk B. The determination of partition coefficient of 6-Mercaptopurine derivatives by thin layer chromatography. *J Chem*, 2013, ID 419194
76. Braumann T. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography; Theory, experimental techniques, and application in Studies on Quantitative Structure-Activity Relationships. *J Chromatogr*, 1986, 373 (2), 191-225
77. Tetko I, Tanchuk V. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J Chem Inf Comp Sci*, 2002, 42(5), 1136-1145
78. Saha G. Fundamentals of nuclear pharmacy. 5th edition. 2003. Springer-Verlag Inc. New York
79. Zhang Z., Kolodziej A., Qi J., Nair S., Wang X., Case A., Greenfield M., Graham P., McMurphy T., Caravan P. Effect of peptide-chelate architecture on metabolic stability of peptide-based MRI contrast agents. *New J Chem*, 2010, 34, 611-616
80. Klucken J., Outeiro T., Nguyen P., McLean P., Hyman B. Detection of novel intracellular α -synuclein oligomeric species by fluorescence lifetime imaging. *FASEB J*, 2006, 20, 2050-2057
81. Torrão A., Café-Mendes C., Real C., Hernandes M., Ferreira A., Santos T., Chaves-Kirsten G., Mazucanti C., Ferro E., Scavone C., Britto L. Different approaches, one goal: to understand the cellular mechanisms of Parkinson's disease and Alzheimer's. *Rev Bras Psiquiatr*, 2012, 34 (suppl.2), S194-S218
82. Kozlov I., Mao S., Xu Y., Huang X., Lee L., Sears P., Gao C., Coyle A., Janda K., Wong C. Synthesis of solid-supported mirror-image sugars: a novel method for selecting receptors for cellular-surface carbohydrates. *ChemBioChem*, 2001, 2, 741-746
83. Wiesehan K., Buder K., Linke R., Patt S., Stoldt M., Unger E., Schmitt B., Bucci E., Willbold D. Selection of D-Amino-Acid peptides that bind to

- Alzheimer's disease amyloid peptide A β ₁₋₄₂ by mirror image phage display. *ChemBioChem*, 2003, 4, 748-753
84. Okarvi S. Recent progress in fluorine-18 labelled peptide radiopharmaceuticals. *Eur J Nuc Med*, 2001, 28 (7), 929-936
85. Miller P., Long N., Vilar R., Gee A. Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O and ¹³N radiolabels for positron emission tomography. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47, 8998-9033
86. Cai L., Lu S., Pike V. Chemistry with [¹⁸F] fluoride ion. *Eur J Org Chem*, 2008, 17, 2853-2873
87. Scott P., Shao X. Fully automated, high yielding production of *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F] fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB), and its use in microwave-enhanced radiochemical coupling reactions. *J Label Compd Radiopharm*, 2010, 53, 586-591
88. Wester H., Hamacher K., Stöcklin G. A comparative study of N.C.A. Fluorine-18 labeling of proteins via acylation and photochemical conjugation. *Nuc Med Biol*, 1996, 23, 365-372
89. Mäding P., Füchtner F., Wüst F. Module-assisted synthesis of the bifunctional labeling agent *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F] fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB). *Appl Rad Isot*, 2005, 63, 329-332
90. Perrin D., Armarego W. Purification of Laboratory Chemicals. 3rd edition. 1988. Pergamon Press, Oxford